

**Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular**

**dSparc protege a las células de la
eliminación por competición
celular en *Drosophila
melanogaster***

**TESIS DOCTORAL
Marta Portela Esteban
Madrid 2010
Universidad Autónoma de Madrid**

**Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid**

**dSparc protege a las células de la
eliminación por competición
celular en *Drosophila
melanogaster***

Memoria presentada por Marta Portela Esteban para optar al grado
de Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de
Madrid

Director de tesis: Dr. Eduardo Moreno Lampaya
Tutor: Dr. Juan Fernández Santarén

**Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CNIO
Madrid 2010**

Agradecimientos

El primer agradecimiento es para Eduardo, director de esta tesis, gracias por darme la oportunidad de empezar en este laboratorio.

A J.F. Santarén, mi tutor, muchas gracias por tu ayuda con las correcciones y por tu disposición hasta el último momento, y por los ánimos!

Gracias a Christa por decidir que Flower era más interesante, y pasarme el proyecto de dSparc, a mí me ha encantado trabajar en él.

A Jesús, Evgeniya, Ismael y Marisa, gracias por los buenos momentos, os deseo mucha suerte en el futuro.

Gracias a todos los que pasaron brevemente por el labo, siempre es interesante que haya gente nueva alrededor, especialmente a Lena, Iva, Lorena, Marta, Elena y Aída.

A los Capetillos y Malumbres compañeros de pasillo, gracias por los préstamos y ayuditas eventuales, echaréis de menos la música de fondo.....jejeje.

A la unidad de Anticuerpos monoclonales, muchas gracias por todo.

A la unidad de microscopía confocal, muchas gracias por vuestra ayuda.

A Pedro H. porque tu pasión por la biología fue muy inspiradora. Gracias también por confiar en mí para darles clase a tus chavales aunque fueran monstruos de 15 años.

A José Martín, porque sin tu ayuda hace ya unos cuantos años esto no habría sido posible...

Agradecimientos

A todos los compis de doctorado, especialmente a Cris, Laura, Bárbara, JuanLu, Eva, Direna y Manu, porque fue divertido hacer los cursos, el DEA y esas cosas con vosotros. Ánimo que ya no os queda nada!

A todas las *Drosophilas* que han muerto para sacar este trabajo adelante, y las que continúan en sus tubos, esperando a ser diseccionadas...

A Cora, compi de fatigas en la facultad, y de los comienzos en el labo, qué habría hecho yo sin tus apuntes? Fue genial pasar toda esa etapa contigo!

A Elisa por tu ayuda siempre, se te ha echado mucho de menos por aquí.

A Bego, porque fuiste la primera referencia que tuve al llegar, me enseñaste cosas muy importantes una pena que te fueras tan pronto, pero me alegré mucho por ti.

A mi música, la que me ha hecho más amenos los ratos de cambiar a las moscas y los de disección. Que me aisló, me calmó o me animó cuando lo necesitaba, y me entretuvo el resto del tiempo.

A Ángel (Dios de la Informática) porque cuando me recuperaste los datos del disco duro de mi portátil maldito me hiciste taaaan feliz! Aquel día me salvaste!! (También gracias por la lucha con el Word 2007, gracias a Edu por esto también!).

A Fidelillo, muchas gracias por todas las veces que me has ayudado, me ha gustado trabajar contigo. Eres un tío muy listo y sé que te irá bien, están siendo tiempos difíciles, pero no te desanimes!!

A los compis del botellín del jueves-viernes, especialmente a Dani y Antonio, ha sido genial conocerlos y sobre todo divertido! Una pena que haya sido tan en la

Agradecimientos

recta final, pero por gente como vosotros ha merecido la pena estar en este centro. Eso, es así!

A la family, gracias por vuestro apoyo hermanitos/as. Especialmente gracias Jose por interesarte siempre por lo que estaba haciendo y también porque sin tu ayuda nome habría ni licenciado...(no se me olvida!). Y a Pablo por muchas cosas pero sobre todo por los viajes a tu costa que de otra forma no habrían sido posibles (ya sabes que esto no está muy bien pagado....), es el mejor regalo que me han hecho nunca. Y a Mamá, gracias por TODO pero sobre todo por quererme tanto a pesar de ser la única que soporta siempre mis malos humos.

A los coleguitas de siempre, Lorien, Patri, Santy, Nuri, Vane, Juan, Karlos, Ali, Al, gracias por vuestros ánimos y apoyo, por escuchar y aguantar alegrías y penas, por no enfadaros por llegar tarde siempre y por entender que los minutos dentro del laboratorio no pasan a la misma velocidad.

A Paco, gracias por tu ayuda y apoyo siempre, por todo lo que me has enseñado, por todas las ideas, sugerencias etc...y porque contigo al lado no necesito flybase! Muchiiiiisimas gracias por echarle un ojo al libro este maldito, y ayudarme con las correcciones, sé que no tenías por qué hacerlo tú.

A Ire, fue genial el tiempo que estuvimos trabajando juntas, te he echado de menos en el labo desde que te fuiste, fueron los tiempos oscuros. Aunque me alegro de haber cambiado las pipetas por cañas y cotis. A ti no te deseo suerte porque no te hace falta, vales un montón y sé que te va a ir muy bien, molaría irnos juntas de posdoc, que no? Te podría haber incluido en coleguitas pero merecías mención aparte.

A Diego, muchas gracias por todo, todas las imágenes bonitas que hay aquí han sido así gracias a tu ayuda. Muchas gracias por enseñarme a usar el confo y por explicármelo todo siempre con esa interminable paciencia. Gracias por el

Agradecimientos

gabinete psicológico que a tanta gente ayudó, por las cañas que hemos compartido (creo que te debo una caja de botellines...), y por mil cosas más que no caben aquí, eres de lo mejorcito que hay por aquí. Te voy a echar muuuucho de menos.

A Sylvia, Jaime y Ali, también coleguitas claro, pero después de más de 3 años viviendo juntos, más que amigos sois hermanos para mí. A parte de gracias por todo, que os voy a decir? Si sois lo único que hoy en día me hace replantearme si me muevo de Madrid o no (con las ganas que tengo yo de emigrar...) ha sido genial vivir con vosotros, se os quiere un montón.

A Manu, también te puedes dar por aludido en coleguitas y coleguitas compis de piso por supuesto, pero te mereces una parrafada para ti solo más que nadie, al fin y al cabo has vivido todo esto muy de cerca desde el principio, muchas gracias por tu apoyo, por estar siempre ahí, por decir lo que necesitaba oír en cada momento y por tu comprensión. Por compartir alegrías y penas, que han sido muchas. Por animarme siempre, te quiero un montón.

A Sergio, a ti te dedico mi tesis. Por dónde empezar...si tengo que agradecerte tantas cosas...muchas gracias, porque cuando tu llegaste, yo me iba, pero tu manera de hacer las cosas me hizo replanteármelo todo, y ya ves si ha merecido la pena al final. No sabía lo que iba a hacer al terminar esta etapa, ahora sé que voy a trabajar en esto siempre, porque así sí, me encanta. Gracias por todo lo que me has enseñado, que es todo lo que sé, no solo las técnicas etc... sino la forma de hacer las cosas bien, a pensarlo todo y tenerlo todo en cuenta a intentar tener una visión global y práctica de las cosas. Volvería a hacer otra tesis, o volvería a empezar solo porque siguieras enseñándome cosas, y por tenerte al lado todos los días, no sabes la envidia que me dan tus futuros estudiantes, no se darán cuenta realmente de los afortunados que habrán sido de tener un jefe como tú hasta que se hayan ido y vean cualquier otro sitio. Me alegro mucho de haber trabajado juntos este tiempo, gracias a ti me he levantado y he venido a trabajar cada mañana con

Agradecimientos

muchas ganas e ilusión. Eres el tío más listo que conozco en todos los sentidos que puede haber, harías bien cualquier cosa pero la ciencia se te da de \$%&*%! Gracias por ayudarme y apoyarme siempre, por animarme, por saber siempre lo que me pasa, por escuchar, por preguntar y por no preguntar, por que las ganas que le pones a todo son contagiosas, porque eres una fábrica de ideas y proyectos geniales, no puedo creer que se nos vayan a quedar tantas cosas a medias...Muchas gracias por cuidarme y cuidar siempre de todo el mundo, aún me dejo cosas que decir, pero creo que ya las sabes. Te quiero un montón

Bro!

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN EN INGLÉS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
1. Modelo animal: <i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.1. Ciclo vital de <i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.2. Discos imaginales.....	11
2. Competición celular.....	12
2.1. <i>Minutes</i>	12
2.2. Factores implicados en competición celular.....	13
2.3. Otros sistemas de competición celular.....	16
2.4. Supercompetición.....	17
3. Myc y cáncer.....	18
4. Cancerización de campo, formación y progresión	
5. tumoral.....	18
6. Competición celular y cáncer.....	22
7. Marcadores específicos de competición celular.....	22
7.1. Flower.....	24
7.2. dSparc.....	25
7.2.1. SPARC mamíferos.....	25
7.2.2. dSparc <i>Drosophila</i>	28
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. Técnicas utilizadas para la generación de clones y expresión	
de genes.....	34
2. Estudio del transcriptoma de <i>Drosophila</i> durante	

competición celular: Análisis de microarrays.....	36
3. Doble detección por inmunofluorescencia de la señal de hibridación de ARN in situ y de GFP.....	37
4. <i>Drosophilas</i> transgénicas generadas.....	40
5. Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i>	40
5.1 Líneas de <i>Drosophila</i> con construcciones de ARNi.....	42
5.2 Detalle de las líneas de <i>Drosophila</i> utilizadas en cada experimento.....	42
6. Cultivos celulares y experimentos de activación de dSparc.....	44
7. Inmunofluorescencia.....	45
8. Anticuerpos.....	45
9. Restricción de dieta.....	46
10. Retinas pupales.....	46
11. Análisis experimental y cuantificaciones.....	47
12. Análisis estadístico de datos.....	47
13. Toma y análisis de imágenes.....	47
RESULTADOS.....	48
1. Selección de posibles marcadores específicos de competición Celular.....	49
2. Validación de dSparc como posible marcador de competición Celular.....	53
3. Detección de dSparc: Anticuerpo específico.....	53
4. dSparc incrementa su expresión en las células perdedoras durante la competición celular.....	54
5. El incremento de los niveles de dSparc ocurre específicamente durante la competición celular.....	57
6. Análisis de epistasis genética.....	59
7. Análisis funcional de dSparc.....	62

8. dSparc no es un inhibidor general de apoptosis.....	69
9. dSparc protege células S2 de una “señal de muerte”	77
10. dSparc y Fwe actúan en diferentes rutas en competición celular.....	81
11. Restricción de dieta.....	83
DISCUSIÓN.....	88
1. dSparc es el primer protector específico de competición celular.....	89
2. Competición celular fisiológica.....	90
3. Proteínas solubles.....	91
4. dSparc, Fwe y Ca^{2+}	92
5. dSparc, competición celular y cáncer.....	94
6. dSparc en tumores.....	95
6.1. Tumores supercompetidores.....	96
6.2. Tumores subóptimos.....	97
6.3. Metástasis.....	98
6.4. Terapias.....	98
7. dSparc, obesidad y cáncer.....	101
CONCLUSIONES.....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	105
ANEXO.....	122

A	Adenina
Aa	Aminoácido
Act	Promotor general de actina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
AKH	Insect adipokinetic hormone
APC	Adenomatosis poliposis coli
Ap	Apterosus
Arm	Armadillo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AuNPs	Nanopartículas de oro
BDGP	Berkeley Drosophila Genome Project
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
Brk	Brinker
BSA	Albumina de Suero Bovina
Bsk	Basket
C	Citosina
C3	Caspasa 3
Ca ²⁺	Ión de calcio
Cald	Calderón
CD2	Cluster of differentiation 2
DGRC	Drosophila Genomics Resource Center
DIC	Después de la Inducción Clonal
DIG	Digoxigenina
ColS	Colaboradores
Cy3	Cyanine3
Cy5	Cyanine5
CyO	Curly-O
Da	Daughterless
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Df	Deficiencia
dIAP1	Drosophila inhibitor of apoptosis 1
DILPs	Drosophila insulin-like peptides
Dlg	Disc large 1
DFP	Después de la Formación del Pupario
DN	mutación dominante negativa
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
Dpp	Decapentaplegic
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra acético
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Egr	Eiger
En	Engrailed
Ep	Elemento P
EST	Expressed sequence tag

FISH	Fluorescence in situ hybridization
Flp	Flipasa
FM7	First chromosome marker 7
FRT	Flipase Recombination Target
Fwe	Flower
G	Guanina
Gal	Galactosidasa
GFP	Proteína fluorescente verde
Gmr	Glass multimer reporter
HA	Hemagglutinin
Hep	Hemipterous
Hh	Hedgehog
Hid	Head involution defective
HNSCC	Head & neck squamous cell carcinoma
Hs	Promotor de choque térmico (Heat shock)
Hsp70	Heat shock protein 70
InR	Insulin receptor
JNK	Jun N(amino)-terminal Kinase
KS	killing signal
LacZ	LacZ-alfa péptido es una parte de la β -galactosidasa
Lgl	Lethal giant larvae
M	Células Minute
Mad-P	Mothers against Dpp fosforilado (forma activa)
MARCM	Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
μ M	Micromol
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimol
MMPs	Matrix metaloproteinases
ng	Nanogramo
nM	Nanomol
PBS	Solución tampón salina (Phosphate Buffer Saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
Pten	Phosphatase and tensin homolog
Puc	Puckered
RFP	Red fluorescent protein
Rpm	Revoluciones por minuto
Rpr	Reaper
S2	Schneider 2
Sb	Stubble
Scrib	Scribbled
Ser	Serrate
Sp	Sternopleura
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cystein

SSC	Saline-sodium citrate
STEM	Short-time series expression miner
SWH	Salvador-Warts-Hippo
T	Timina
TGF- β	Transforming Growth Factors β
Tkv	Thick veins
TM3	Third chromosome marker 3
TM6b	Third chromosome marker 6b
TNF	Tumor necrosis factor
TOR	Target of rapamicin
Tub	Promotor general de tubulina
UAS	Upstream Activating Sequence
Ubi	Ubicuo
UTR	Untranslated region
VDRC	Vienna Drosophila RNAi Center
w	White
Wg	Wingless
Wt	Wild type
y	Yellow
β gal	Beta-galactosidasa
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado

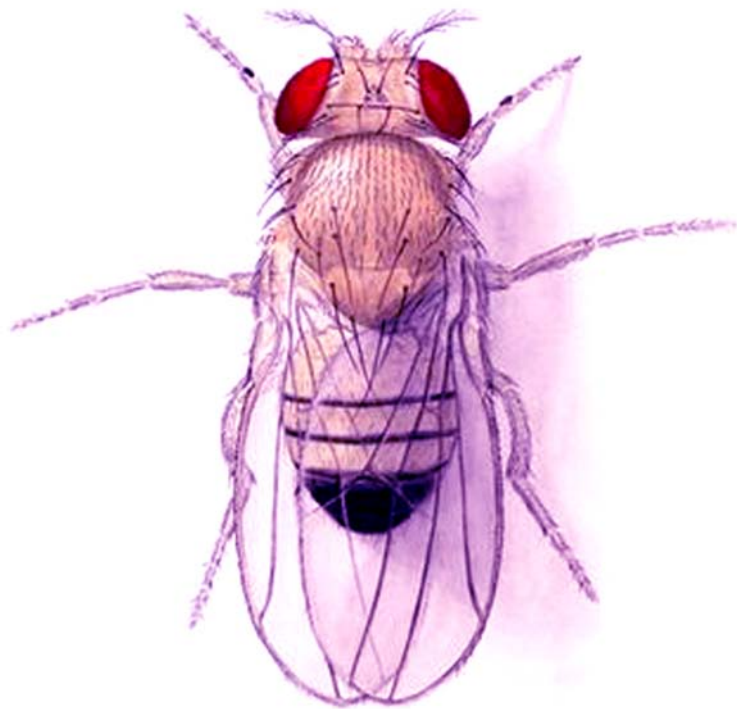
Drosophila dSparc prevents cell competition

During cell life, cells accumulate mutations that can change their fitness. Cell competition is a phenomenon that occurs among cells with different metabolic rates. Cells with a proliferative advantage (winners) induce apoptosis in loser cells and then displace them. Cell competition prevents the accumulation of less fit cells and maintains cell number unchanged in tissues. Field cancerization does not imply morphological alterations and seems to be related with cell competition.

We have identified the *Drosophila* dSparc as an early marker upregulated in loser cells. dSparc provides a transient shielding against cell-to-cell differences in cellular fitness, by setting a higher threshold for caspase activation in loser cells. This mechanism may allow useful cells to recover from transient and limited damage before they are unnecessarily eliminated by the winners. If the differences in cellular fitness persist, cell competition induced apoptosis is nevertheless triggered. dSparc expression might have a function in restoring homeostasis in damaged tissues. Our models of cell competition based in dMyc expression or stress allow us to study the function of dSparc in cell competition.

Human homologue of dSparc has a variable expression in many tumors, promoting tumour development, metastasis and field cancerization, in the other hand, human dSparc also can act as a tumour suppressor. The reason of these opposite functions remains unsolved. So, our work in *Drosophila* dSparc could help to understand the dSparc role in human tumors.

INTRODUCCIÓN



1. Modelo animal: *Drosophila melanogaster*

El estudio de *Drosophila melanogaster* comenzó a principios del siglo XX, y su estudio intensivo (sobre todo en las últimas décadas) ha permitido determinar diferencias y similitudes genéticas entre vertebrados e invertebrados. *Drosophila* tiene varias ventajas: es pequeña, muy barata y fácil de mantener, su ciclo vital es muy rápido (9 días), permite tener una gran cantidad en un espacio pequeño, su genética es sencilla (sólo tiene 4 pares de cromosomas) y existen muchas cepas con mutaciones y alteraciones en el ADN pre-existentes a la era genómica. La existencia de cromosomas balanceadores (en los que la recombinación meiótica está impedida) permite mantener indefinidamente estas alteraciones cromosómicas. Además, durante la última década se han desarrollado diversas herramientas moleculares específicas de *Drosophila* que permiten controlar la expresión de un gen temporal y espacialmente o inactivar la función de un gen en una subpoblación de células dentro de un tejido.

Además fue uno de los primeros organismos pluricelulares cuyo genoma fue secuenciado completamente (Adams y cols. 2000). Al compararlo con el genoma humano encontramos un 60 % de genes comunes. Así, el estudio de la mosca del vinagre nos permite entender mejor cómo funciona el cuerpo humano y la base genética y celular de ciertas enfermedades, contribuyendo así a conseguir tratamientos efectivos contra ellas (Venter y cols. 2001).

1.1. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*.

Drosophila es un insecto holometábolo (es decir, con metamorfosis completa): la larva adquiere el tamaño adulto y entonces entra en fase de pupa, tras la cual surge un individuo adulto completamente diferente a la larva y con su tamaño definitivo. Como los insectos son organismos poiquilotermos (no mantienen su temperatura corporal constante), la duración de su ciclo vital depende de la temperatura. A 25°C tienen un ciclo vital de 9 días, contados desde la puesta del huevo hasta la emergencia del adulto (Figura 1A). El huevo eclosiona a las 22 horas de la puesta y se suceden 3 estadios larvarios con una duración total de 4 días. En cada estadio, la larva crece rápidamente hasta

llegar al tamaño máximo que le permite la cutícula y en ese momento realiza la muda, pasando al estadio siguiente. Mientras los dos primeros periodos larvarios duran cada uno 24 horas, la larva pasa dos días en 3er estadio. Durante la fase larvaria proliferan unas estructuras epiteliales en forma de saco, llamadas discos imaginales, que darán lugar al esqueleto externo de la mosca. Una vez la larva alcanza el tamaño definitivo, pasa a estadio de pupa donde realiza la metamorfosis, emergiendo el individuo adulto o imago al cabo de 4 días. Durante esta fase, la mayoría de los tejidos larvarios serán destruidos y reemplazados por tejidos adultos (Figura 1B-D).

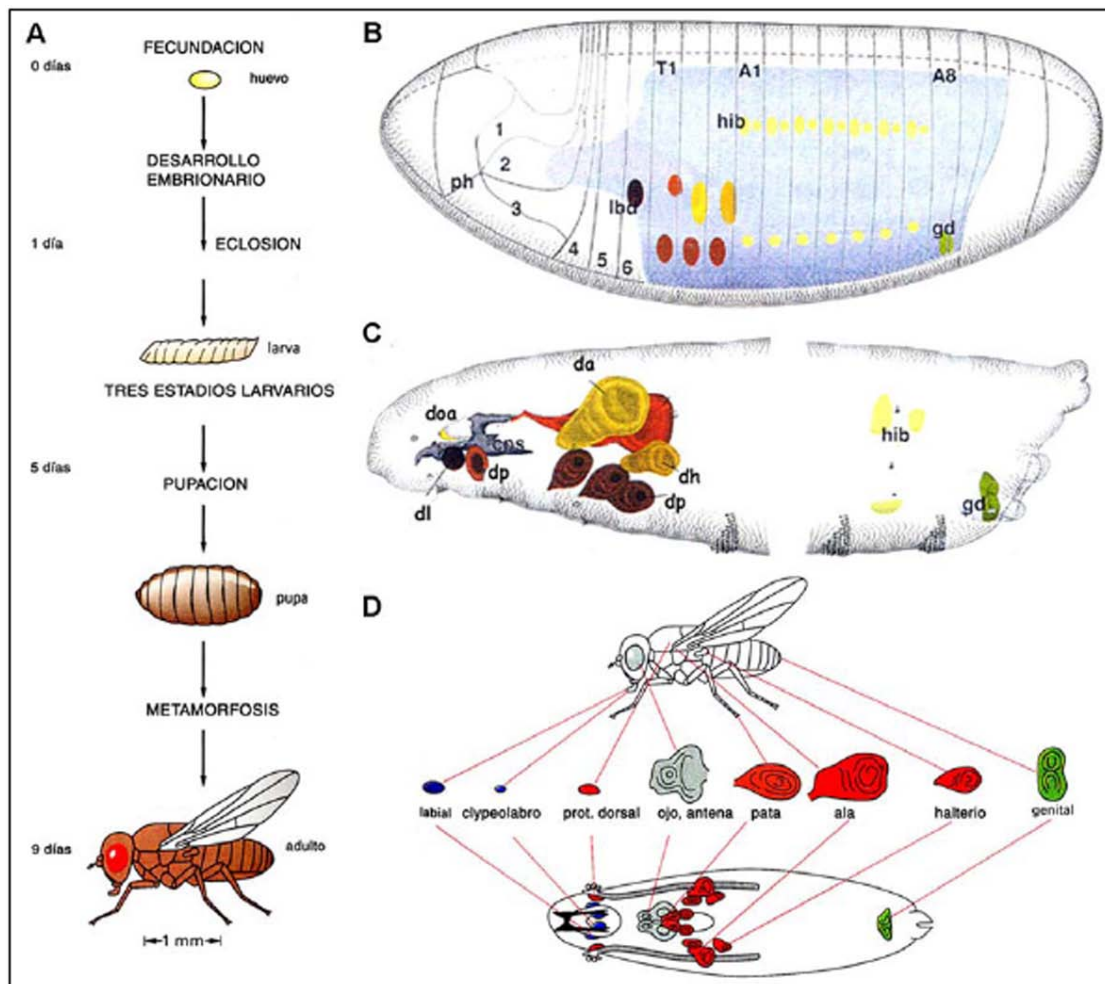


Figura 1. Ciclo vital de *Drosophila*. Esquemas del embrión y larva. (A) Ciclo vital de *Drosophila* a 25°C (tomado de Alberts, 1994). (B, C) Esquema de un embrión al final del desarrollo embrionario con los primordios imaginales y una larva de tercer estadio con los discos propiamente dichos. En el embrión están señalados los segmentos torácicos 1 (T1), abdominales 1 y 8 (A1 y A8). Se muestran el disco labial (lb), disco de ojo-antena (do), de ala (da), de halterio (dh), de pata (dp), disco genital (dg) e histoblastos (hib). Cedido por Silvia Aldaz. (D) Correspondencia de los discos imaginales con las estructuras adultas que forman (tomado de Alberts, 1994).

1.2. Discos imaginales

Los discos imaginales provienen de células ectodérmicas indiferenciadas del embrión que son reclutadas al final de la embriogénesis y que expresan genes específicos de tejido imaginal (Cohen y cols. 1993). Estas células se invaginan y forman los primordios imaginales, con características diferentes a las células larvarias, las cuales sufren procesos de endoreplicación (y, por tanto, adquieren mayor tamaño) y expresan genes que impiden la formación de células imaginales (Pierce y cols. 2004). Durante la fase larvaria las células de los primordios proliferan activamente y adquieren una expresión genética diferencial necesaria para dar lugar a la forma adulta. El patrón adulto ya está establecido en el disco imaginal maduro: las diferentes regiones del disco exhiben una estricta determinación para dar lugar a partes específicas de la cutícula adulta tras la metamorfosis (Bryant, 1971) (Figura 2). En cambio, el abdomen se forma a partir de grupos de células denominados histoblastos que proliferan durante la pupación.

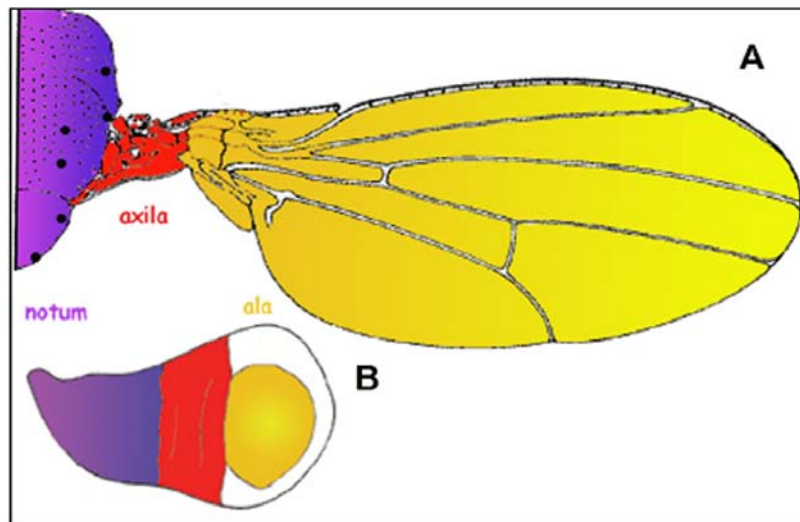


Figura 2. Esquema de tórax y ala de adulto y de disco imaginal. Visión dorsal de las estructuras adultas (A) y de un disco de tercer estadio (B). Correspondencia entre la zona presuntiva de ala (amarillo), de axila (rojo) y *notum* (violeta) y las estructuras adultas. La región blanca da lugar a las pleuras (cedido por Silvia Aldaz).

2. Competición celular

Drosophila ha surgido como un modelo óptimo para estudiar la competición celular: los discos imaginales de las larvas son epitelios donde la competición celular puede ser estudiada mediante la generación de clones de células. Las herramientas disponibles en *Drosophila* permiten la inducción de sistemas de expresión clonal (Blair 2003), es decir, el sistema FRT/Flp (Xu y Rubin 1993), que permite la generación de células con características específicas que crecen y se desarrollan como clones de células en los discos imaginales. Este sistema en combinación con el sistema de expresión Gal4-UAS (Brand y Perrimon 1993) permite la expresión de construcciones de *ARNi* (Boutros y Ahringer 2008) o sobreexpresión de genes específicamente en células de esos clones. Ambas técnicas se pueden utilizar al mismo tiempo para estudiar el crecimiento de células genéticamente modificadas en contacto con células silvestres. El gran conocimiento de la genética de *Drosophila* y la secuenciación completa de su genoma facilitan la identificación de genes candidatos y su estudio. Además, más del 75% de los genes identificados en enfermedades humanas tienen homólogos en *Drosophila* (Reiter y cols. 2001). Durante la última década, muchos modelos de crecimiento tumoral en *Drosophila* han contribuido a la identificación de nuevas vías de señalización involucradas en patogénesis como por ejemplo Salvador-Hippo-Warts, Notch, Lgl-Scrib-dlg, EGFR-Pi3K entre otros (Zhao y cols. 2010; Thompson y cols. 2005; Vaccari y Bilder 2005; Hariharan y Bilder 2006; Vidal y Cagan 2006; Humbert y cols. 2008; Read y cols. 2009). No obstante, todavía se conoce muy poco sobre las vías de señalización involucradas en competición celular (Bondar y Medzhitov 2010; Marusyk y cols. 2010; Zecca y Struhl 2010).

2.1. Minutes

La competición celular fue descubierta por primera vez en *Drosophila melanogaster* cuando dos poblaciones celulares con diferentes velocidades metabólicas se pusieron en contacto, y se observó que las células más lentas, pero viables, no proliferaban debido a la presencia de células metabólicamente

más activas (Morata y Ripoll 1975). Para ello se usaron unos mutantes llamados *Minute*, con mutaciones dominantes en genes que codifican proteínas ribosomales, que causan una biogénesis reducida de ribosomas, lo que produce como resultado crecimiento lento. Sin embargo, cuando las células *M/+* se enfrentan con células silvestres en el disco imaginal de *Drosophila*, las primeras son eliminadas (Morata y Ripoll 1975), posteriormente se descubrió que la eliminación de estas células se producía por apoptosis (Moreno y cols. 2002a) (Figura 3).

Este fenómeno también ha sido observado en mamíferos (Bondar y Medzhitov 2010; Tamori y cols. 2010; Oliver y cols. 2004; Oertel y cols. 2006; Sansom y cols. 2007).

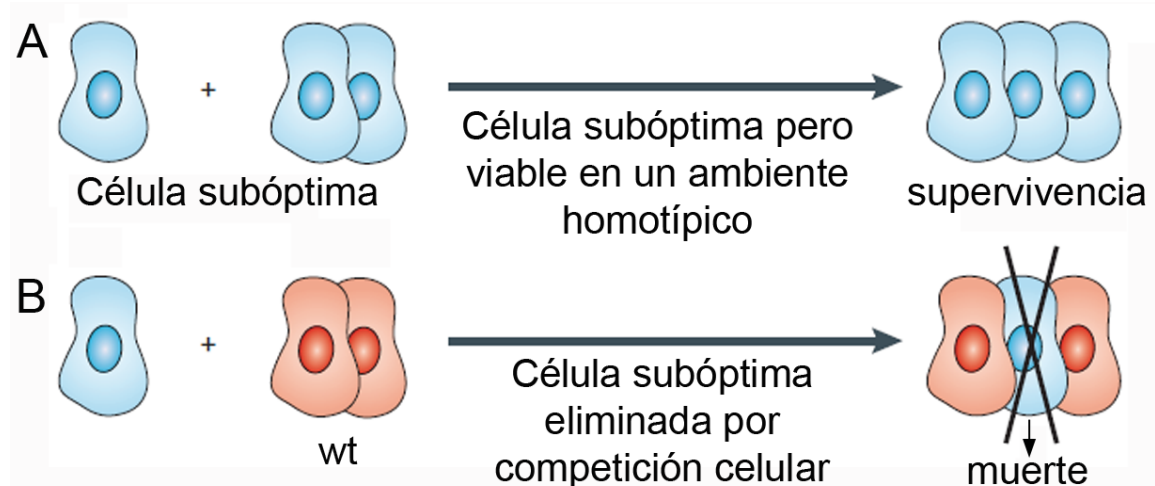


Figura 3. Competición celular. (A) Un clon de células con genotipo mutante es viable cuando está situado entre células del mismo genotipo. (B) Las células mutantes son eliminadas por apoptosis cuando están situadas entre células silvestres (*wt*). Este podría ser un mecanismo para eliminar células subóptimas y optimizar el tejido (Modificado de (Moreno 2008)).

2.2. Factores implicados en competición celular

Se ha propuesto que células con alteraciones en genes de la ruta de la insulina podrían ser eliminadas por competición celular. Dichas observaciones derivan de experimentos realizados con mutaciones en genes de la ruta como *chico* que es el homólogo en *Drosophila melanogaster* del sustrato del receptor de la vía (IRS) (Bohni y cols. 1999) o como *calderón* (*cald*), que

codifica una proteína que funciona como transportador orgánico de cationes y que es diana de la misma ruta (Herranz y cols. 2006).

Mutaciones en la ruta de las BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) en *Drosophila* (Dpp) también pueden ser capaces de generar competición celular al causar distorsiones en los niveles de expresión de *brinker* (*brk*) (regulador negativo de la vía) (Burke y Basler 1996; Campbell y Tomlinson 1999; Jazwinska y cols. 1999). *brk* es un represor transcripcional que reprime la expresión de los genes diana de Dpp y es regulado negativamente por Dpp (Campbell y Tomlinson 1999; Jazwinska y cols. 1999). Dpp es un factor de crecimiento y supervivencia secretado que forma un gradiente proteico extracelular a lo largo del eje antero-posterior del disco imaginal del ala de *Drosophila melanogaster* (Teleman y Cohen 2000; Tabata y Takei 2004). Las células que transducen Dpp con menor eficiencia o incapaces de transducir Dpp sobreviven poco en la región media del disco de ala, donde los niveles de Dpp son mayores. (Burke y Basler 1996). Mutaciones en *thickveins* (*tkv*), (el receptor de Dpp), también pueden ser capaces de generar competición celular al causar distorsiones en los niveles de expresión de *brk*. Los clones mutantes de *tkv* incrementan la expresión de *brk*, y son eliminados excepto en las regiones laterales del disco donde normalmente hay elevados niveles de Brk (Moreno y cols. 2002a), de manera similar ocurre con las células *M/+* (Moreno y cols. 2002a). La implicación de la vía de Dpp en competición celular es importante puesto que un aumento puntual de la expresión de *brk* en algunas células de un tejido parece ser condición suficiente para inducir competición celular (Moreno y cols. 2002a).

Otro de los grupos de genes que se han visto relacionados con competición celular a través de Dpp, son aquellos relacionados con endocitosis. dRab5 es una proteína requerida para la formación de vesículas de endocitosis y fusión de estas con endosomas tempranos. Niveles suficientes de la GTPasa Rab5 son necesarios para la endocitosis de Dpp (Tsukazaki y cols. 1998; Entchev y cols. 2000). La expresión de la forma dominante negativa de dRab5 en clones de células silvestres causa un incremento en los niveles de Brk y su eliminación por competición celular (Moreno y cols. 2002a). La

sobreexpresión de dRab5 en las células perdedoras durante el proceso de competición inhibe la eliminación de estas células (Moreno y Basler 2004).

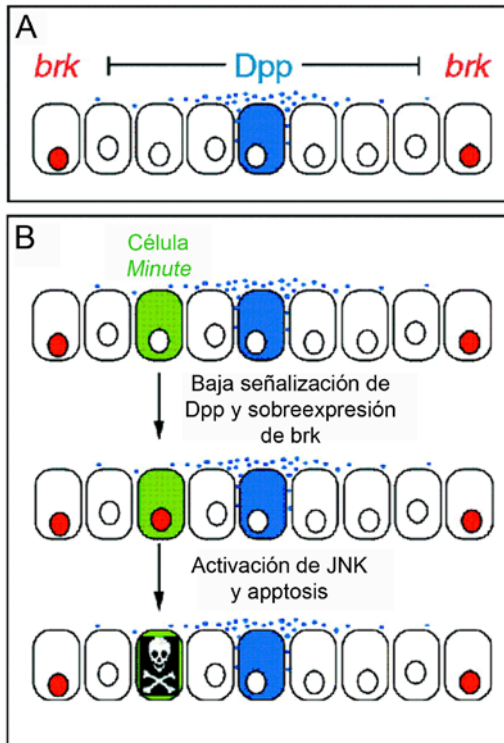


Figura 4. Factores implicados en competición celular. (A) Ilustración esquemática del epitelio del disco imaginal de ala. Dpp (azul) se expresa en el centro del disco y forma un gradiente simétrico. Dpp limita la expresión de *brk* (rojo) a las regiones laterales del disco. (B) Células *Minute* (verde) cerca de la fuente de Dpp expresan *brk*, llevando a la activación de la vía JNK y a la apoptosis. (Modificado de (Milán y cols. 2002)).

Cuando hay una disrupción en el gradiente normal de Dpp (y como consecuencia en el gradiente Brk) se activa la vía Jun N(amino)-terminal Kinase (JNK), que produce apoptosis (Adachi-Yamada y cols. 1999) (Figura 4). La vía de JNK es capaz de producir una muerte celular masiva cuando se activa ectópicamente en discos imaginales de *Drosophila*, a través del aumento de expresión de genes pro-apoptóticos como “*head involution defective*” (*hid*) y “*reaper*” (*rpr*) (Moreno y cols. 2002b).

La ruta JNK produce apoptosis morfogenética, que permite eliminar células con posiciones erróneas en el disco imaginal de ala, debido a la aparición de discontinuidades en la recepción de morfógenos como Dpp, *wingless* (*Wg*) y *Hedgehog* (*Hh*) (Adachi-Yamada y cols. 1999; Adachi-Yamada y O'Connor 2002). Además, se ha descrito que es la activación de la JNK la que induce apoptosis en los clones *M/+* que son eliminados del epitelio imaginal (Moreno y cols. 2002a).

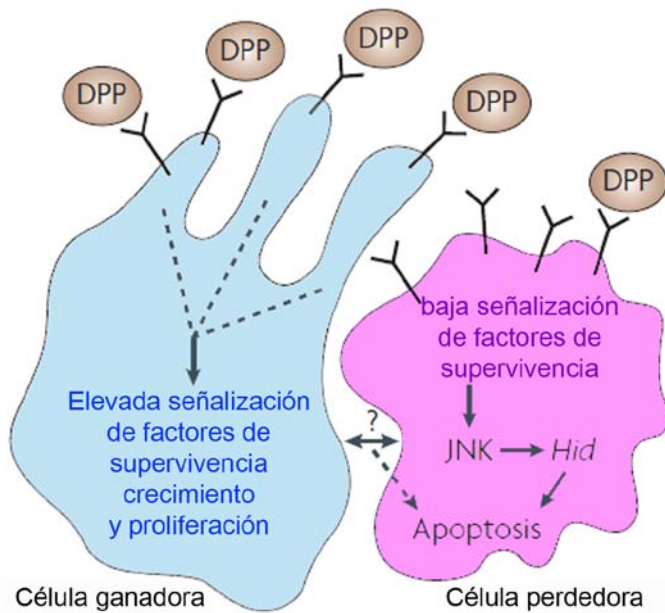


Figura 5: La hipótesis de captura de ligando. Las células compiten por factores de supervivencia extracelulares y de crecimiento como Dpp. Las células ganadoras son capaces de obtener más factores de supervivencia. Las células perdedoras tienen baja señalización de supervivencia como consecuencia de la competición y activan la vía JNK y la transcripción de *hid* que desencadena apoptosis. La comparación de los niveles de Dpp entre las células a través de un mecanismo desconocido podría ser importante para la inducción de apoptosis. (Modificado de (Moreno 2008)).

2.3. Otros sistemas de competición celular

Los *Minutes* fueron el primer sistema en el que se observó la competición celular. Sin embargo otras mutaciones se han relacionado con procesos competitivos.

Mutaciones o alteraciones que afectan a *dmyc*. El factor de transcripción *dmyc* es el homólogo de la familia *myc* de factores de transcripción de mamíferos (*c-myc*, *N-myc* y *L-myc*) y son funcionalmente similares (Gallant y cols. 1996). Regula genes involucrados en metabolismo celular y controla la expresión de muchos genes involucrados en el crecimiento celular y proliferación (Johnston y cols. 1999). Así, mutaciones en *dmyc*, como el alelo hipomorfo *dmyc^{P0}*, inducen competición de la misma manera que ocurre con los *Minute*. En presencia de células silvestres, las células *dmyc^{P0/P0}* son eliminadas del tejido por apoptosis (Johnston y cols. 1999; Moreno y Basler 2004).

Células con mutaciones en genes supresores de tumores como "*lethal giant larvae*" (*lgl*) o "*scribbled*" (*scrib*) se comportan de manera similar a las células *Minute* y son eliminadas por competición celular (Brumby y Richardson 2003; Grzeschik y cols. 2007). En estos casos, las células perdedoras son las que llevan estas mutaciones y son eliminadas por apoptosis inducida por las

células silvestres circundantes. Células *scrib*^{-/-} sobreproliferan sin problemas de viabilidad, pero cuando se encuentran rodeadas por células silvestres, mueren por apoptosis (Brumby y Richardson 2003).

Otro grupo de alteraciones genéticas que inducen competición celular son las que afectan a la ruta Salvador–Warts–Hippo (SWH), ya que células mutantes para algunos de sus componentes son capaces de inducir la muerte por apoptosis de las células silvestres de su entorno (Tyler y cols. 2007).

2.4. Supercompetición

Existe otro tipo de competición celular donde las células perdedoras son las silvestres. Al incrementar la actividad de *dmyc*, estas células crecen más de lo que deberían a expensas de eliminar a las células silvestres (de la Cova y cols. 2004; Moreno y Basler 2004). Las células que ganan *dmyc* son capaces de inducir apoptosis en las células silvestres circundantes, que en esta situación son perdedoras (Figura 6). Debido a que la sobre-proliferación de las células que sobreexpresan *myc* está contrarrestada por la apoptosis de las células vecinas, el número total de células se mantiene constante y no provoca malformaciones morfológicas (de la Cova y cols. 2004). Este fenómeno donde la célula mutada adquiere una ventaja se conoce como supercompetición (Moreno y Basler 2004).

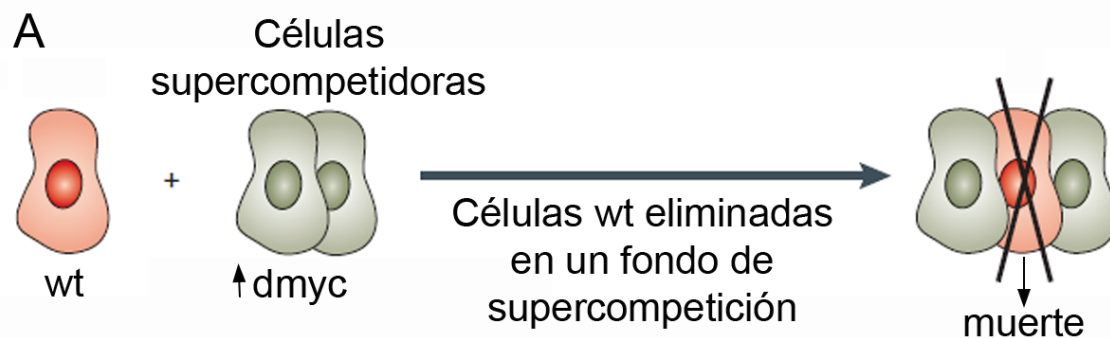


Figura 6. Supercompetición. Células mutantes son capaces de eliminar células silvestres (wt). La supercompetición podría contribuir a la progresión del cáncer antes de que las malformaciones morfológicas sean detectables. (Modificado de (Moreno 2008)).

3. Myc y cáncer

En mamíferos, el exceso de actividad de *c-myc* está relacionado con tumores agresivos y poco diferenciados. Translocaciones del gen *c-myc* que desregulan su expresión, se encuentran en linfomas y plasmacitomas. Aparece amplificado en varios tipos de cáncer (como pulmón e hígado), además de tener niveles elevados de expresión en un tercio de carcinomas de hígado y colon. La activación de *c-myc* por otras rutas de señalización (*APC*, *BCR-ABL*, *c-src*, *wnt*) juega un papel esencial en la transformación tumoral causada por dichas rutas (Dang y cols. 1999). Por tanto, *c-myc* aparece en una gran cantidad de tumores humanos. Sin embargo, debido a que la mayoría de los tumores humanos son demasiado grandes cuando se detectan (y a menudo con muchas alteraciones genéticas) es difícil determinar si *c-myc* es causante de la iniciación del tumor o aparece en las últimas etapas como una consecuencia. Se asume que el papel predominante de *c-myc* en la iniciación y progresión tumoral es el de inducir proliferación incontrolada acompañada de des-diferenciación (Pelengaris y cols. 2002).

El cáncer es un proceso secuencial que requiere de una serie de mutaciones en genes supresores de tumores y proto-oncogenes para transformar una célula normal en un tumor maligno con capacidad invasiva (Fearon y Dang 1999). Mientras que los primeros requieren de su inactivación para inducir cáncer, los segundos provocan tumoricidad cuando se sobre-activan. *p53* es un ejemplo de gen supresor, mientras que *c-myc* lo es de proto-oncogén. Ambos están implicados en muchos tipos de cáncer, y a menudo tienen una mala prognosis (Soucek y Evan 2010; Brown y cols. 2009).

4. Cancerización de campo, formación y progresión tumoral

Uno de los modelos que permitiría explicar como toda una serie de mutaciones y alteraciones génicas pueden darse simultáneamente en las mismas células, es la cancerización de campo. El concepto de cancerización de campo fue inicialmente propuesto por Slaughter en 1953 (Slaughter y cols. 1953) basándose en observaciones histológicas, para explicar la persistencia con la que aparecían tumores secundarios, una vez eliminado quirúrgicamente

el tejido tumoral primario. El término se ha empleado para describir múltiples terrenos de enfermedad premaligna, con una prevalencia mayor de la esperada de aparición de múltiples tumores primarios o secundarios locales y la presencia de tumores distantes sincrónicos (Slaughter y cols. 1953). La consecuencia de las alteraciones genéticas precoces es que la célula alterada adquiere una ventaja proliferativa sobre el resto de las células del epitelio. Se crea así un campo precanceroso expansivo que va progresivamente reemplazando al epitelio normal. Los campos precancerosos son expansivos aunque no invasivos. Esta capacidad invasiva define al cáncer y marca la diferencia entre campo precanceroso y cáncer. La capacidad invasiva se adquiere presumiblemente por la suma de eventos oncogénicos más tardíos (Slaughter y cols. 1953). Actualmente, el funcionamiento del proceso de cancerización de campo se encuentra mejor establecido en el contexto del carcinoma de células escamosas de cuello y cabeza (HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma) (revisado en (van Oijen y Slootweg 2000)).

Para generar un tumor, son necesarias un mínimo de 3 a 12 mutaciones diferentes dependiendo del tipo celular y el tumor (Merlo y cols. 2006). Teniendo esto en cuenta, la supercompetición podría ser un posible mecanismo que facilitaría un proceso de cancerización de campo durante las etapas tempranas de la formación de tumores e incrementaría la posibilidad de mutaciones adicionales que dieran lugar a un tumor. Todavía se conoce poco sobre los estadios iniciales de la formación de tumores. La relación entre los procesos de cancerización de campo y competición celular vendría mediada por la aparición de alteraciones genéticas capaces de inducir supercompetición. Mutaciones que produzcan mayores niveles de *myc* en una célula, harán que esta adquiera propiedades supercompetitivas desplazando paulatinamente del tejido a las células normales circundantes.

Modelo hipotético para las etapas tempranas de la progresión tumoral

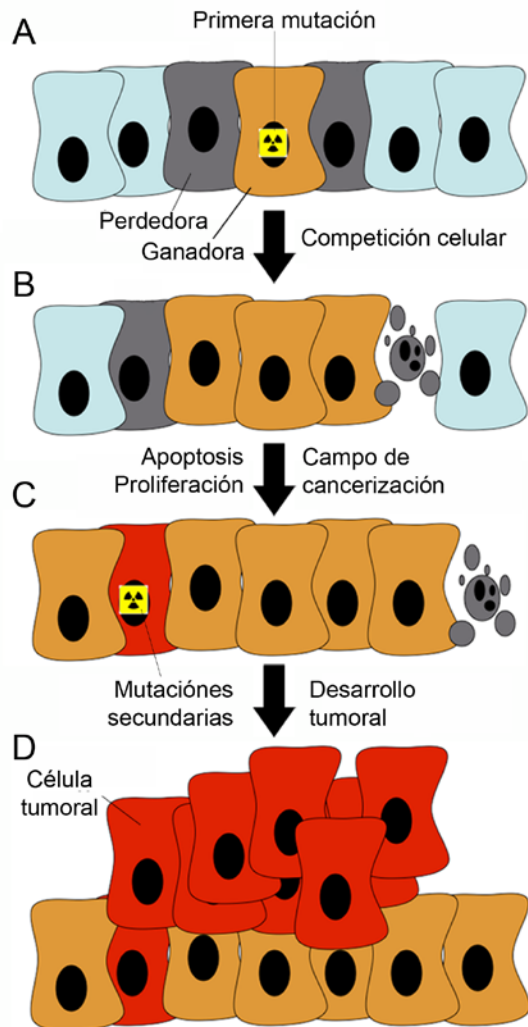


Figura 7. Representación esquemática de las etapas tempranas de la formación de tumores. Células epiteliales silvestres sobreexpresan myc, después de la exposición a un mutágeno (A) ocurren cambios genéticos en supresores tumorales o oncogenes que convierten a la célula silvestre en una supercompetidora. Como resultado, se inicia el proceso de competición celular en un tejido compuesto por células ganadoras (naranjas) y perdedoras (gris). Las células perdedoras son eliminadas del tejido por apoptosis (B) y las células ganadoras pueden expandir su territorio generando un campo precanceroso (C). Si tuvieran lugar mutaciones adicionales que afectaran oncogenes y/o genes supresores de tumores en estas células, se podría generar un tumor (D). (Cedido por S. Casas-Tintó)

Si un tejido silvestre es expuesto a un mutágeno, una de estas células mutadas podría crecer y colonizar una región del tejido mediante supercompetición. Sin embargo, estas células no inducen malformaciones morfológicas y por lo tanto son indetectables para los patólogos. Si hay una nueva exposición al mutágeno o la exposición inicial se mantiene, una de estas células podría sufrir mutaciones adicionales y malignizarse. Cuanto mayor es este clon de células precancerosas, más probable podría ser una segunda o tercera mutación, lo que resultaría en la generación de células tumorales (Figura 7).

Uno de los problemas del cáncer es que el mínimo tamaño detectable que los patólogos identifican como un tumor pequeño, ya compromete a mil millones de células (10^9). Estos tumores ya acumulan varias mutaciones en

oncogenes y genes supresores de tumores y su malignidad potencial es más elevada comparada con las células de una cancerización de campo con una sola mutación. Este pequeño tumor estaría tan solo a 10 rondas de división del tamaño máximo de un tumor compatible con la vida (10^{12} células) (Rhiner y Moreno 2009) (Figura 8).

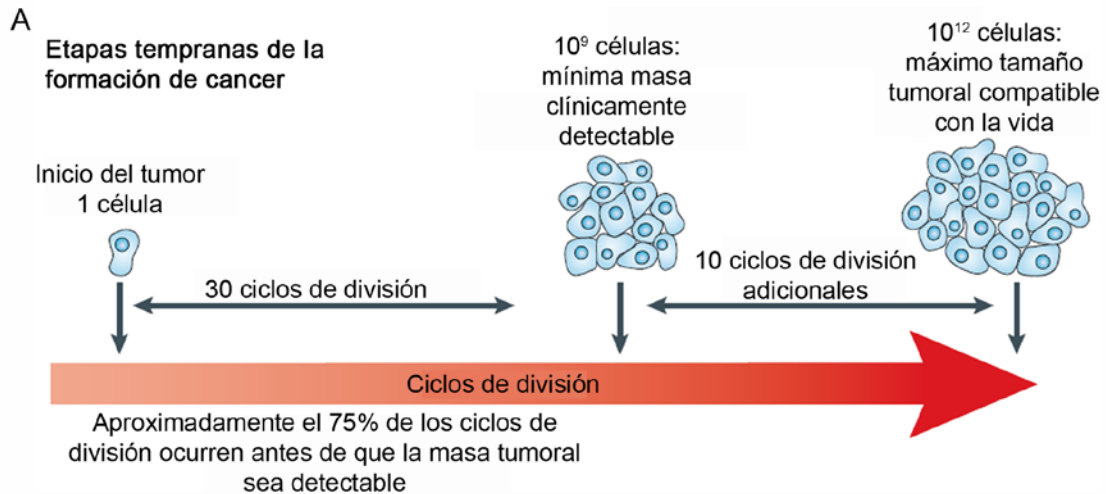


Figura 8. Los números del cáncer: Una célula transformada debe dividirse al menos 30 veces para producir 10^9 células, esta es la mínima masa detectable clínicamente. Pero solo 10 rondas de división adicionales son necesarias para producir un tumor de 10^{12} células, que habitualmente es el tamaño máximo compatible con la vida. Alrededor del 75% de los ciclos de división ocurren antes de que los cambios morfológicos puedan ser detectados. (Modificado de (Moreno 2008)).

El mecanismo de estos eventos tempranos que tienen lugar en la cancerización de campo es desconocido y la falta de marcadores específicos dificulta la detección de estos eventos pre-tumorales. Se ha propuesto que la expansión de las células pre-tumorales puede depender no solo de su potencial proliferativo si no también podría requerir un proceso de competición celular para expandirse a expensas de las células silvestres circundantes (Moreno y Basler 2004; Moreno 2008).

Se ha propuesto que en esta situación, la supercompetición podría ser un evento clave para regular la expansión de la cancerización de campo, y se incrementaría la probabilidad de adquirir mutaciones adicionales tumorigénicas (Rhiner y Moreno 2009). Así, bloqueando la competición celular se podría prevenir la aparición y la progresión tumoral.

5. Competición celular y cáncer

La detección temprana es crucial para una mejor prognosis del cáncer. Si los campos pre-tumorales pudieran ser identificados antes, los tratamientos podrían ser más efectivos y la prognosis de los pacientes sería mejor. Si los elementos clave que tienen una función en competición celular fueran identificados, estos eventos tempranos podrían ser detectados y se podría retrasar la progresión tumoral.

También las células metastásicas tienen que competir para colonizar nuevos tejidos en el organismo. Se ha postulado que los genes implicados en metástasis podrían ser los mismos que los que están mutados inicialmente en tumores primarios (Klein 2008), por lo tanto la competición celular podría ser relevante para la metástasis. Estas proteínas serían dianas ideales para tratamientos específicos como inmuno-quimioterapia, pudiendo retrasar la eliminación de las células silvestres durante la progresión tumoral, o también se podrían elegir como blanco para la eliminación las células mutadas malignizadas.

6. Marcadores específicos de competición celular

Se ha descrito que la supercompetición puede ser modulada por dos factores: Primero, compensando el déficit de factores extracelulares de las células perdedoras incrementando la endocitosis. Esto previene la apoptosis y facilita la supervivencia de las células silvestres rodeadas por células que sobreexpresan *dmvc* y como consecuencia, las ganadoras no se pueden expandir y el tamaño de los clones *dmvc* es menor (Moreno y Basler 2004); Segundo, inhibiendo directamente la apoptosis en las células silvestres perdedoras mediante la sobreexpresión de *p35* (Moreno y cols. 2002a), mutaciones en *hid* (de la Cova y cols. 2004) o sobreexpresando *dIAP1* ("*Drosophila inhibitor of apoptosis 1*") (Moreno y Basler 2004), lo que permite su supervivencia, y a la vez previene la expansión de las células *dmvc* ganadoras. Desde que se demostró que la apoptosis de las células perdedoras es necesaria para la proliferación de las células que ganan *dmvc* (Moreno y Basler

2004), este crecimiento de las células ganadoras se definió como apoptosis dependiente de proliferación (Moreno 2008).

Hasta ahora no se conocía ningún gen específico de competición, por lo tanto no era posible diseñar una estrategia para modular estadios tumorales tempranos. La posibilidad de realizar estudios sobre el genoma completo de *Drosophila* y la validación funcional mediante hibridación in-situ posibilitan la identificación de genes nuevos involucrados en competición celular (Tyler y cols. 2007). En nuestro laboratorio hemos utilizado las técnicas de análisis de expresión utilizando microarrays han permitido la identificación de genes sobreexpresados o atenuados en competición celular (Rhiner y cols. 2010). Las técnicas de ARN de interferencia han permitido la validación de estos candidatos a marcadores de competición celular in-vivo.

Las células Schneider 2 de *Drosophila* también han contribuido a dar con mecanismos implicados en competición celular. Se ha descrito que cuando se mezclan dos poblaciones de células S2 con diferentes niveles de *dmyc*, se producen interacciones celulares similares a las que tienen lugar en el disco imaginal de ala durante cuando se induce competición celular. Hay datos que indican que las dos poblaciones celulares participan y son necesarias en el proceso competitivo porque liberan factores solubles en el medio (Senoo-Matsuda y Johnston 2007). En nuestro laboratorio hemos observado que una molécula secretada participa en el proceso como una señal de muerte (killing signal, KS) e induce apoptosis en las células perdedoras, pero la identidad de esta señal secretada durante la competición celular no se ha probado todavía. No obstante, el ligando de la superfamilia TNF en *Drosophila*, Eiger (Igaki y cols. 2002), puede activar la vía JNK y desencadenar apoptosis (Moreno y cols. 2002b) y se ha propuesto que podría jugar un papel durante el desarrollo tumoral en *Drosophila* (Cordero y Cagan 2010; Igaki y cols. 2006; Igaki y cols. 2009).

6.1. Flower

Hemos identificado recientemente la proteína de membrana Flower (Fwe) como componente de la maquinaria de respuesta de competición celular

que se requiere para marcar las células como ganadoras o perdedoras (Rhiner y cols. 2010). Este gen fue descrito en 2009. Se llamó *flower* debido a su fenotipo mutante en la unión neuromuscular de la larva de *Drosophila* (Yao y cols. 2009). Se propuso que el producto de *fwe* era un canal de calcio con una función en la endocitosis durante las sinapsis que tienen lugar en el sistema nervioso de *Drosophila*. Durante la competición celular, mediante splicing alternativo *fwe* da lugar a tres isoformas proteicas que conforman un código: Fwe^{ubi} , Fwe^{Lose-A} y Fwe^{Lose-B} . Niveles basales de Fwe^{ubi} son producidos constantemente. Durante la competición celular las formas Fwe^{Lose} se sobreexpresan en las células perdedoras. Las comparaciones entre células de los niveles relativos de Fwe^{ubi} y Fwe^{Lose} determinan finalmente cual de las células será eliminada por apoptosis inducida por competición celular (Figura 9).

Este código implica una comunicación célula-célula donde la célula que expresa Fwe^{Lose} es eliminada solo si está en contacto con una célula vecina que expresa Fwe^{ubi} . La expresión de Fwe^{LoseA} y Fwe^{LoseB} en todo el organismo no incrementa la apoptosis ni la eliminación de estas células. Además si se inhibe la expresión de *fwe* mediante un *ARNi* específico, se previene la eliminación de las células perdedoras durante la competición celular, y por tanto la expansión de las ganadoras se ve reducida. La falta de *Fwe* en un clon de células rodeadas por células silvestres que expresan *fwe^{ubi}* también produce la eliminación de las células mutantes, en este caso perdedoras. Los ortólogos de ratón se encuentran en estudio actualmente, pero también existen varias isoformas cuya expresión se regula durante la competición celular en el embrión de ratón de forma similar a lo que ocurre en *Drosophila*.

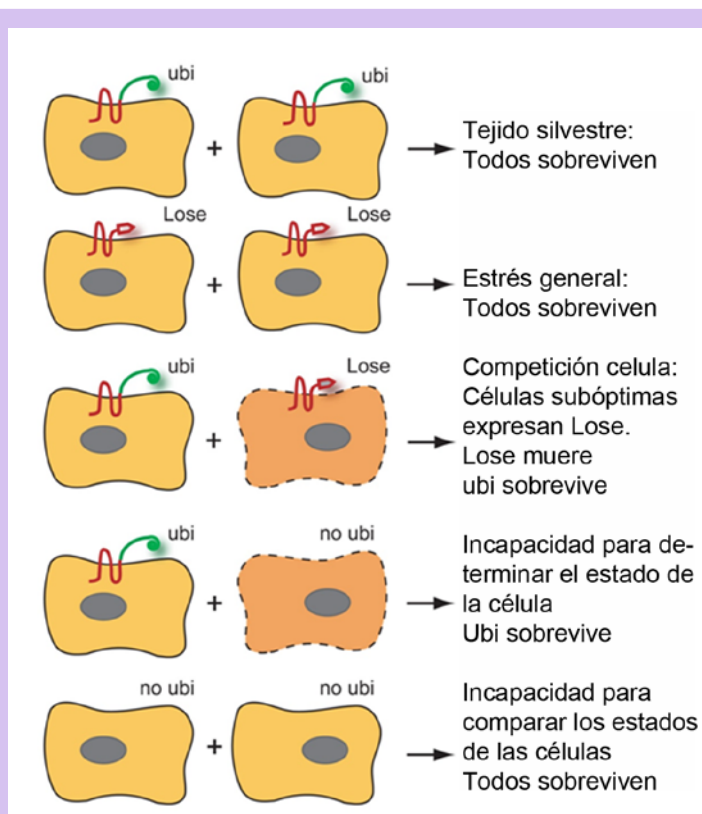


Figura 9. Código Fwe: Modelo de comunicación célula-célula dependiente de Fwe durante competición celular. En un tejido sano las células producen constantemente elevados niveles de Fwe^{ubi} que marca células ganadoras. Un incremento de expresión uniforme de las formas Fwe^{Lose} no activan apoptosis dependiente de competición celular. Sin embargo cuando un grupo de células tienen un déficit de aptitud que induce la expresión de las formas Fwe^{Lose} , éstas son reconocidas por las células silvestres circundantes que expresan Fwe^{ubi} y son eliminadas por apoptosis. La competición celular también se activa si una célula que expresa bajos niveles de Fwe^{ubi} o no lo expresa está rodeada por células silvestres que expresan Fwe^{ubi} . Si la expresión de Fwe se pierde en

todo el tejido la competición celular no se activa y las células subóptimas se pueden acumular. (Modificado de (Rhiner y cols. 2010)).

6.2. dSparc

Uno de los genes que se encontraron en la búsqueda realizada en nuestro laboratorio para detectar marcadores tempranos de competición celular fue *dsparc* (CG6378), el homólogo en *Drosophila* de SPARC de mamíferos.

6.2.1. SPARC mamíferos

SPARC ("Secreted Protein, Acidic, Rich in Cysteine también llamada BM40 o Osteonectina") forma parte de un subgrupo de glicoproteínas de unión a Calcio que forman parte de la familia de proteínas matricelulares. Las proteínas matricelulares no contribuyen significativamente a la estructura de la matriz extracelular, pero actúan modulando interacciones célula-célula y célula-matriz. Se expresan durante la morfogénesis, desarrollo, lesiones tisulares y remodelación de tejidos (Bornstein 1995). SPARC codifica una proteína con péptido señal que consta de tres dominios proteicos (Figura 10).

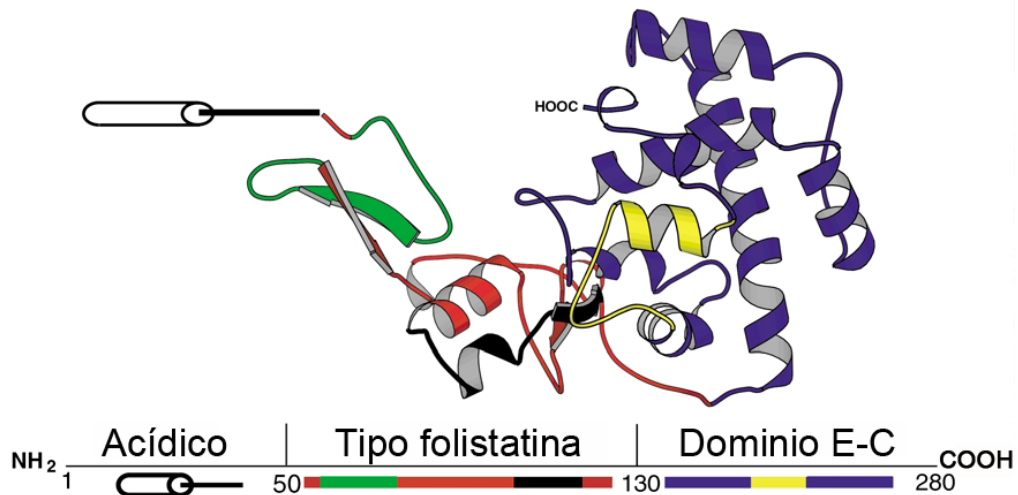


Figura 10. Estructura proteica de SPARC: Diagrama derivado de datos cristalográficos muestra los tres dominios modulares de SPARC. Dominio I ácido de unión a calcio de baja afinidad, sitio de reticulación de transglutaminasa, inhibe propagación celular. Dominio II tipo folistatina, inhibe proliferación, anula adhesiones focales, contiene el péptido angiogénico (K)GHK. Dominio III *E-F hand* de unión a calcio de alta afinidad, inhibe propagación celular y proliferación, anula adhesiones focales entre células y entre células y matriz. (Modificado de (Bradshaw y Sage 2001)).

SPARC se expresa en todas las capas embrionarias de mamíferos durante el desarrollo. La mayor parte de SPARC en el embrión se encuentra en el tejido mineralizante. En el adulto la expresión se restringe a tejido óseo, riñón, testículos, tejido hematopoyético y sistema nervioso central (Lane y Sage 1994).

Análisis en ratones SPARC^{-/-} demuestran que SPARC afecta al ensamblaje de redes de colágeno y colágeno fibrilar (Norose y cols. 2000; Bradshaw y cols. 2003b; Sangaletti y cols. 2003). Los ratones SPARC^{-/-} desarrollan varios fenotipos como resultado de una desorganización en la deposición de la matriz extracelular: desarrollan cataratas a los dos meses de edad, lo que sugiere un papel de SPARC en la transparencia de los cristalinicos como resultado del mal ensamblaje y estabilidad de la lámina basal del cristalino (Gilmour y cols. 1998). Extensiones celulares del epitelio del cristalino penetran e invaden la lamina basal y la cápsula del cristalino contiene una distribución alterada de colágeno IV y laminina (Yan y cols. 2002). Estos ratones tienen la piel laxa, masa ósea total disminuida, dermis fina, mayor almacenamiento de grasa, osteopenia progresiva y una característica cola

rizada debido a los defectos en la matriz extracelular (Bradshaw y Sage 2001; Framson y Sage 2004). Muestran deficiencias en el tejido conectivo, como disminución en los niveles de colágeno I en la piel, tejido adiposo, corazón y hueso (Bradshaw y cols. 2003a; Bradshaw y cols. 2003b; Delany y cols. 2003).

SPARC es inducido durante la curación de heridas, en lugares de angiogénesis y por el estroma durante la formación de tumores (Reed y cols. 1993; Mendis y cols. 1998; Podhajcer y cols. 2008b). SPARC puede afectar a la progresión tumoral a diferentes niveles. Durante los estadios tempranos SPARC parece estar implicado en transformación y malignización (Robert y cols. 2006). SPARC también juega un papel relevante en la transición epitelio-mesénquima (Robert y cols. 2006; Sosa y cols. 2007). Durante la progresión tumoral, SPARC es producido por las células tumorales o por el microambiente (endotelio, sistema inmune y fibroblastos) está involucrado en la escapada del tumor mediante la inhibición de la vigilancia del sistema inmune y promoviendo angiogénesis (Ledda y cols. 1997; Sangaletti y cols. 2003; Alvarez y cols. 2005; Lau y cols. 2006; Prada y cols. 2007). Finalmente SPARC también está involucrado en la agresividad de las metástasis (Jacob y cols. 1999; Minn y cols. 2005; Campo McKnight y cols. 2006) (Figura 11).

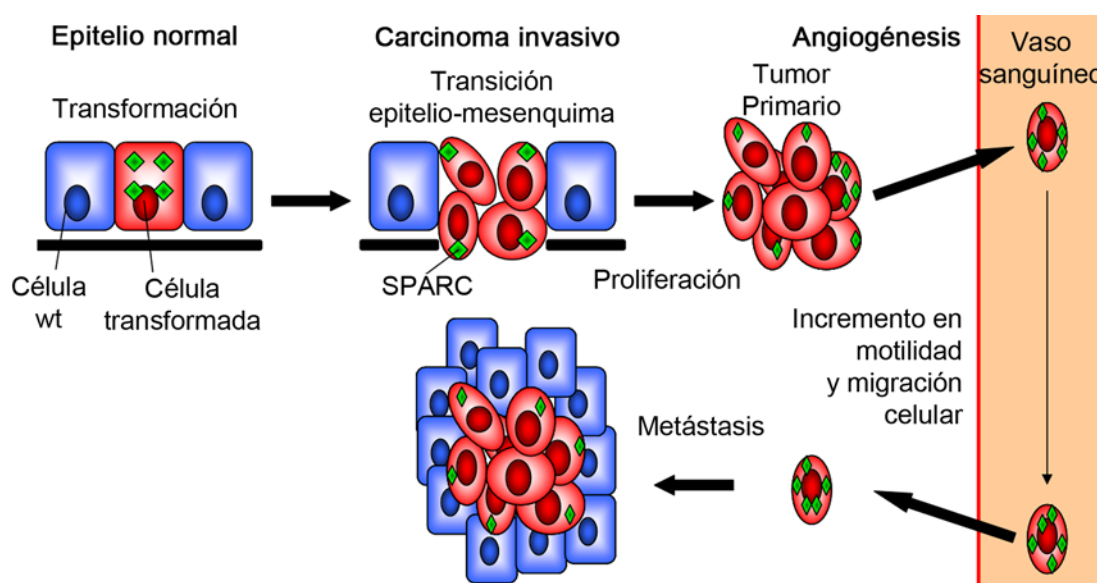


Figura 11. Efectos de SPARC durante la progresión tumoral: SPARC es capaz de actuar en la progresión tumoral en diferentes niveles: En etapas tempranas SPARC está implicado en la transformación. También juega un papel en la transición epitelio-mesénquima. SPARC se

expresa en el tumor facilitando su progresión. Favorece metástasis incrementando motilidad y migración celular (Modificado de (Podhajcer y cols. 2008a)).

En el modelo de ratón de “*Adenomatosis Poliposis Coli*” (APC)^{min/+} donde se forman tumores espontáneos en el intestino, la expresión de SPARC está incrementada indicando que podría participar en la formación tumoral temprana. En los ratones APC^{min/+}/SPARC^{-/-} se suprime la formación de adenomas (Sansom y cols. 2007).

Muchos tipos de cáncer tienen la expresión de SPARC alterada (Framson y Sage 2004; Clark y Sage 2008; Podhajcer y cols. 2008a).

Sin embargo, los datos publicados sobre la función de SPARC durante la formación de tumores son inconsistentes y a menudo contradictorios, incluso entre los mismos tipos de tumores. Parece que la capacidad de SPARC de promover o inhibir la progresión tumoral depende del tipo celular que lo inicia, el estadio tumoral y el contexto del microambiente tumoral (Arnold y Brekken, 2009).

6.2.2. dSparc *Drosophila*

dSparc es el homólogo en *Drosophila* de SPARC de mamíferos. dSparc es una glicoproteína matricelular de 32-35 kD que se une a colágeno IV, con motivos de unión a calcio y su organización modular está conservada filogenéticamente desde nematodos hasta humanos (Figura 12).

Durante la embriogénesis el *ARNm* de *dsparc* se expresa en derivados de mesodermo, hemocitos y el cuerpo graso. dSparc es secretado por hemocitos y células del cuerpo graso y se concentra en la lámina basal que rodea a los órganos internos (Figura 13A-B). dSparc es necesario para la estabilidad de la lamina basal dependiente de colágeno IV (Figura 13 C-E). Durante la ovogénesis los transcritos de *dsparc* se encuentran en las células somáticas del germario y de los folículos. La reducción de producción de dSparc mediante ARNi produce letalidad embrionaria (Martinek y cols. 2008).

[illegible]

Figura 12: Conservación evolutiva de SPARC desde nematodos a mamíferos. Alineamiento vertical de los ortólogos de SPARC en vertebrados e invertebrados. Las letras minúsculas representan el péptido señal. Residuos ácidos del dominio I en rojo y básicos en azul. Residuos de cisteína conservados en los dominios II y III en gris oscuro para resaltar su conservación entre los ortólogos. Los residuos de cisteína involucrados en la formación de los puentes disulfuro de la *EF hand II* se muestran en gris claro (Martinek y cols. 2002).

La inhibición de la expresión de *dsparc* en *Drosophila* produce varias anomalías del desarrollo: daños en la condensación de la cuerda nerviosa central, ausencia de colágeno IV en la lámina basal embrionaria derivada de los hemocitos, pérdida de la integridad del cuerpo graso, tráqueas, desorganización neuronal y de la glía (Martinek y cols. 2002).

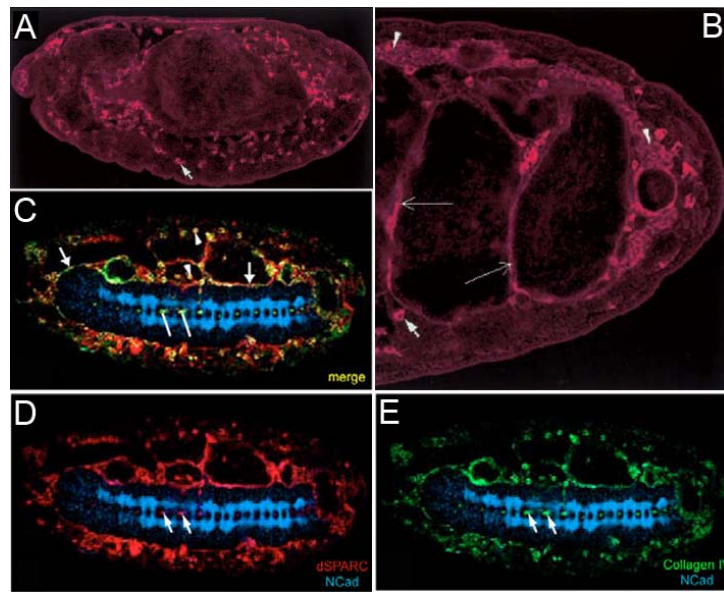
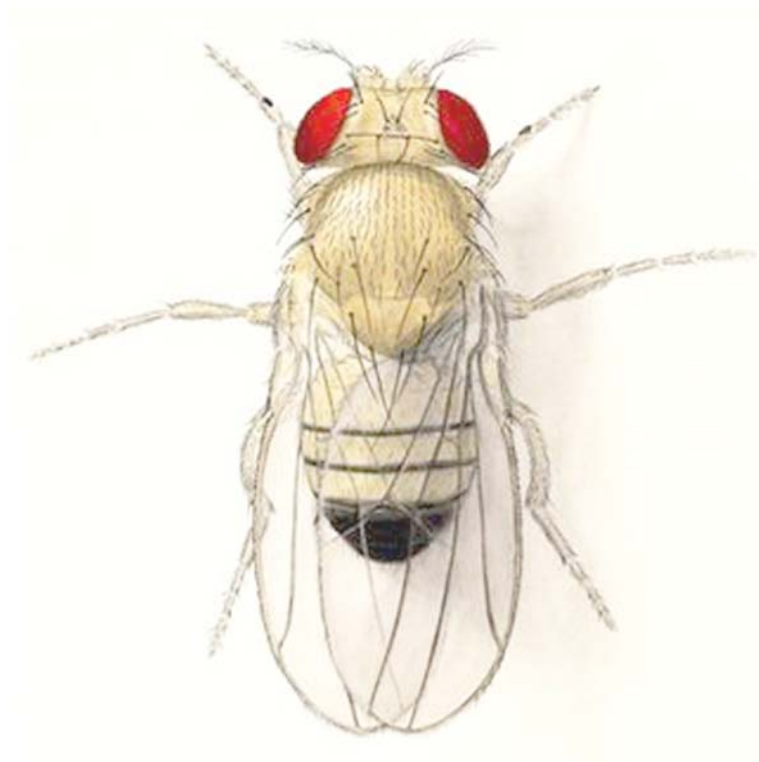


Figura 13. Expresión de dSparc en el embrión de *Drosophila*: (A) Inmunohistoquímica que muestra la presencia de dSparc en hemocitos en un embrión de estadio 14 (flecha). (B) inmunofluorescencia muestra a dSparc en hemocitos (flecha), cuerpo graso (punta de flecha), y lámina basal que rodea los órganos internos (flechas largas) (Martinek y cols. 2002). (C-E) Embrión silvestre de estadio 15 teñido con dN-cadherina (azul), dSparc (rojo) y colágeno IV (verde). Las flechas marcan la glía canal (C) La imagen combinada muestra que dSparc y colágeno IV colocalizan en la lámina basal que rodea la cuerda nerviosa central (flechas), los hemocitos (cabezas de flecha) y la glía canal (líneas) (Martinek y cols. 2008).

OBJETIVOS

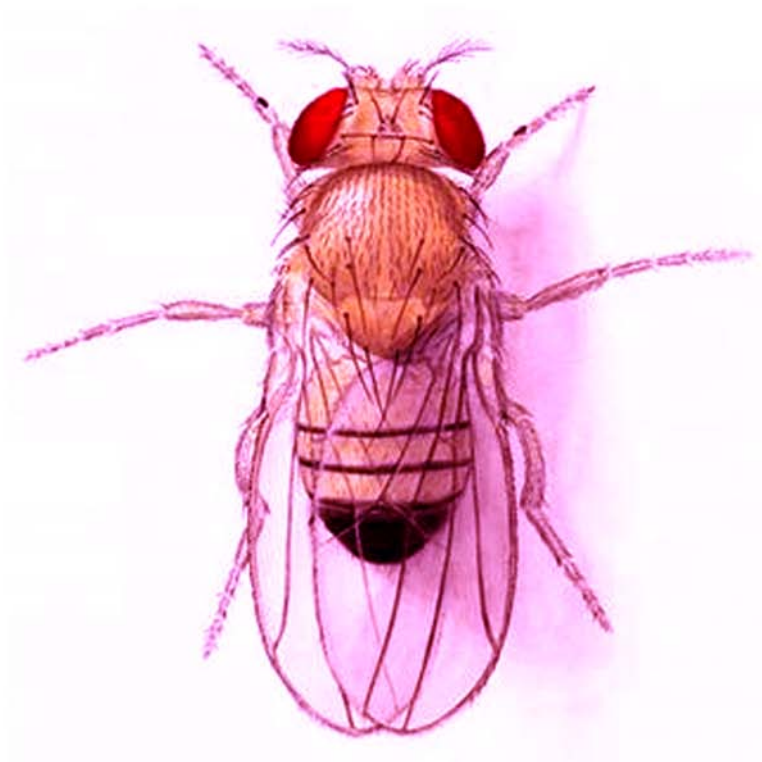


El objeto principal de este trabajo es estudiar dSparc como posible marcador de competición celular en *Drosophila melanogaster*.

Para ello, se establecieron los siguientes objetivos:

- Estudiar la expresión de dSparc durante la competición celular.
- Comprobar la especificidad de la expresión de dSparc durante competición celular.
- Averiguar si otros participantes en competición celular regulan su expresión.
- Analizar la función de dSparc por medio de experimentos de falta de función y de ganancia de función.
- Señalar las relaciones de dSparc con otros marcadores de competición celular.
- Relacionar la función dSparc en *Drosophila* con su papel durante el desarrollo de cáncer en mamíferos.

MATERIALES y MÉTODOS



1. Técnicas utilizadas para la generación de clones y expresión de genes

Para generar clones de recombinación mitótica se utilizó la técnica *Flp-FRT* (Xu y Rubin 1993). La recombinasa *Flipase* (*Flp*, que reconoce las secuencias *FRT* (*Flipase Recombination Target*) e induce recombinación entre ellas) está bajo control de un promotor de choque térmico (*hs*) inducible a 37°C. Partimos de un par de cromosomas homólogos, uno con la mutación a estudiar, el otro generalmente con un marcador, y en ambos cromosomas hay secuencias *FRT* situadas en la misma posición, cerca del centrómero. Una vez producida la recombinación, tras la mitosis y segregación de los cromosomas, en la mitad de los casos se genera una célula homocigótica para el alelo mutante (que carece del marcador) y una homocigótica para el alelo silvestre, con el marcador (clon gemelo o “*twin-spot*”) (Figura 14).

El sistema *Gal4/UAS* permite la expresión dirigida de un gen cuya región codificante está bajo control de secuencias *UAS* (*Upstream Activating Sequence*) (Brand y Perrimon 1993). El activador transcripcional *Gal4* es capaz de unirse a dichas secuencias y activar la transcripción. La expresión del gen *Gal4* puede depender de un promotor construido por nosotros o del “*enhancer*” de un gen endógeno que reproduce total o parcialmente su expresión (Figura 14).

Para inducir un aumento en la expresión se usa el sistema *Gal4/UAS* combinado con *FRT/Flp*. El factor de recombinación *Gal4* es capaz de reconocer las secuencias *UAS* (*Upstream Activating Sequence*) y activar la expresión de cualquier gen adyacente. Para regular la expresión, se utiliza una construcción del factor *Gal4* bajo el control de un promotor constitutivo de *actina*. Sin embargo, ambos están separados por secuencias *FRT* en tándem entre las cuales hay un codón de parada, impidiéndose la traducción del *Gal4*. Al inducirse la expresión de la *flp* por un choque térmico, se elimina dicho codón y el factor *Gal4* activa la expresión de *UAS-GFP* (para marcar los clones) y del gen de interés. Existen colecciones disponibles (VDRC) de construcciones *UAS-ARN* de interferencia que permite eliminar el *ARNm* de

13000 genes, lo que permite hacer experimentos de falta de función utilizando este mismo sistema (Figura 14).

El factor Gal80 impide la actividad del Gal4. Al combinar ambos sistemas que consiste en utilizar el sistema de pérdida de función en el que el cromosoma silvestre contiene *tub-Gal80*, por lo que al inducir el golpe de calor las células mutantes lo pierden, permitiendo la actividad del factor Gal4. De esta forma, podemos perder la función de un gen y ganar la actividad de otro. A este sistema se le conoce como *MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker)* (Figura 14).

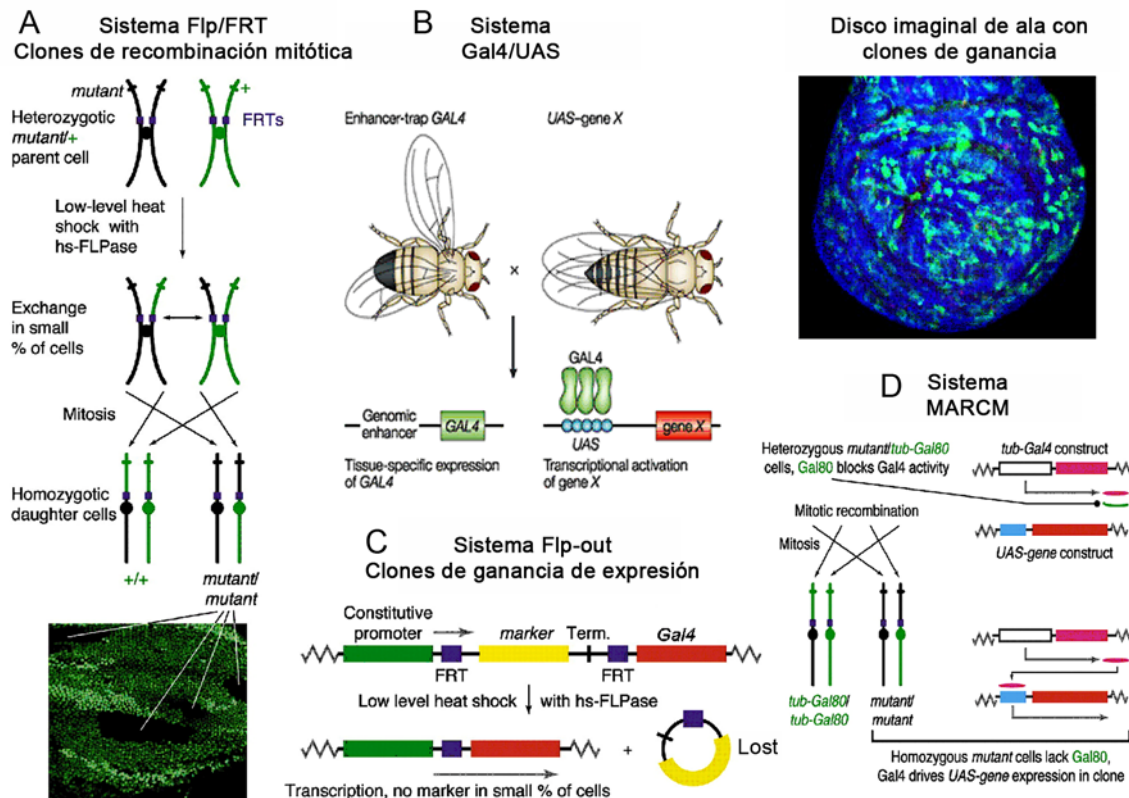


Figura 14: Esquemas de las técnicas más comunes en *Drosophila*. (A) Sistema Flp/FRT. La enzima Flp, tras ser inducida por un choque térmico, induce la recombinación mitótica entre cromosomas homólogos. Tras la mitosis, se generan dos células hijas, una homocigótica para la mutación, otra homocigótica para el marcador. (B) Sistema Gal4/UAS. Un transgen que contiene un promotor conocido acoplado al gen *Gal4* induce su expresión regulada y estimula la transcripción del ADN situado tras las secuencias *UAS*. (C) Sistema Flp-out. La secuencia codificante de un gen está separado del promotor por la inserción de un gen marcador flanqueado por secuencias *FRT*. Así, el gen no se expresa y sí lo hace el marcador. La expresión de *flp* elimina el marcador y permite la expresión del gen. En nuestro caso se usa como gen *Gal4*, que permite dirigir la expresión de cualquier otro gen bajo control de *UAS*, estudiando cómo se comporta una única célula con niveles altos del gen de interés (tomado de (Tabata 2001)). (D) Técnica MARCM. Las células son heterocigóticas para una mutación y además expresan *tub-Gal80*, en cromosomas homólogos con secuencias *FRTs*. El inhibidor

tub-Gal80 (expresado de forma ubicua y capaz de impedir la actividad del factor Gal4) es eliminado usando la técnica FRT/Flp. De esta forma, la recombinación mitótica crea un clon de células que son a la vez mutantes para un gen y que expresan otro bajo control de secuencias UAS (tomado de (Blair 2003)).

2. Estudio del transcriptoma de *Drosophila* durante competición celular: Análisis de microarrays

Los ARNs utilizados en este análisis se obtuvieron de larvas con un transgén con el promotor del gen de la *tubulina1*, que se expresa de forma ubicua, controlando la expresión de *dmyc*. La composición del transgen (*tub>dmyc>Gal4*) permite que tras expresar la *flipasa* (*flp*), las secuencia *FRT* recombinan y se generan clones de células silvestres (en relación a la expresión de *dmyc*) que a la vez sobreexpresen *Gal4*. Además, estas células silvestres están marcadas con los reporteros LacZ y GFP (*UAS-lacZ* y *UAS-GFP*).

Los discos imaginales experimentales (*tub>dmyc>gal4*) se ven afectados durante el desarrollo de la competición celular con un característico patrón espacio-temporal: primero se eliminan las células del centro del disco imaginal de ala y después la muerte celular tiene lugar en los bordes del primordio. En paralelo, se generaron clones de células silvestres marcados también con *lacZ* y GFP, gracias a la expresión de la construcción génica control (*tub>CD2>Gal4*). En estos clones las células GFP-positivas generadas proliferan normalmente sin competición.

Se establecieron cuatro puntos experimentales para seguir los perfiles de expresión: 0 horas (sin choque térmico): Éste es el punto inicial de análisis, en el que se normalizan los datos experimentales de los demás puntos de análisis. Este punto permite descartar aquellos genes regulados directamente (o indirectamente) por la sobreexpresión de *dmyc*. El ARN total se extrajo de los discos imaginales de ala de larvas (control y experimento) de *Drosophila melanogaster* en estadio 3 que estuvieron creciendo a una temperatura controlada de 25°C. Se realizó la extracción de ARN 12, 24 y 48h después de la inducción de los clones (choque térmico en agua durante 15 minutos a 37°C).

Para mantener la integridad del ARN total de los discos imaginales de ala, se diseccionaron las larvas en frío, se depositaron las muestras en tubos de centrifuga con una mezcla al 50% de 1x PBS (NaCl 137mM, Na₂HPO₄-2H₂O 10mM, KCL 2,7mM, KH₂PO₄ 2mM) y RNAlater (Ambion). La extracción del ARN total se hizo por homogenizado de las muestras en reactivo TRIZOL (Invitrogen) y extracción de la fase orgánica con cloroformo, seguido por la purificación en columnas RNAeasy (Qiagen).

Una vez obtenido el ARN total de cada muestra y su duplicado, se procedió a su transcripción reversa, marcaje e hibridación según las indicaciones del protocolo para marcaje e hibridación “Direct Labelling & Hybridization Protocol” del DGRC, Universidad de Indiana, Estados Unidos. Las muestras de cada pareja de experimentos y su duplicados fueron marcadas con fluoróforos diferentes (Cy3 y Cy5) y las intensidades relativas (de verde a rojo) fueron analizadas usando “Agilent Bioanalyzer 2100” (Agilent Technologies). Posteriormente, los datos de las lecturas del robot “Agilent Bioanalyzer 2100” fueron normalizados, analizados y reorganizados mediante el uso del programa de análisis de perfiles de expresión STEM. Este programa de análisis permite clasificar los genes según perfiles de cambio de expresión preestablecidos, analizando tanto los niveles de expresión como la bondad de ajuste de dichos perfiles. (Ernst y cols. 2005).

3. Doble detección por inmunofluorescencia de la señal de hibridación de ARN in situ y de GFP

Para sintetizar los cebadores (Invitrogen) y obtener el ADN molde, se eligieron fragmentos de la secuencia de ADN sin intrones. Delante de cada cebador se colocaron los promotores de las ARN polimerasas Sp6 y T7. (La sonda de ARN se obtendrá con la enzima cuyo promotor se haya colocado delante del cebador en 3'). Una vez obtenidos los cebadores se generó el ADN molde mediante una PCR a partir de ADN genómico de *Drosophila melanogaster*. El producto de la PCR se comprobó en una electroforesis en un gel de agarosa 0,7%, a 75 mV. Se realizó la purificación del ADN molde mediante el kit comercial (PCR purification Kit 50, Qiagen). Se obtuvo ADN

eluído en 30 µL de tampón de elución. Se midió la concentración de ADN que había en cada muestra por absorbancia a 260nm el Nanodrop. Se incubó durante 2h a 37°C 1µg de ADN molde de cada muestra y se añadieron NTPs marcados, inhibidor de ARNasas y las ARN polimerasas T7 y SP6 del DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) de Roche. Se paró la reacción con 20µL de EDTA 0,2M pH 8,0. Las sondas de ARN se precipitaron con LiCl a una concentración final de 20mM. Se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto para eliminar los nucleótidos no incorporados y se enfriaron las muestras a -70°C durante 20'. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10' a 4°C. Se realizaron dos lavados con etanol 70% a -20°C y después se dejó secar. Se resuspendió la muestra en 50 µL de agua libre de ARNasas. Se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa 1% durante unos 10' a 130mV como medida de control para comprobar que había ARN y se guardaron las sondas de ARN a -20°C. Las sondas se obtuvieron utilizando los cebadores específicos detallados a continuación, que contienen en su extremo 5' secuencias de reconocimiento para las ARN polimerasas de los fagos T7 y Sp6.

Cebadores *dsparc* **Sp6**:

5'ATTAGGTGACACTATAGAAGAGTCTGCACCAATACCAACGAG 3'

dsparc **T7**:

5'TAATACGACTCACTATAGGGAGACGATGGTCCTTGTGGAGTC 3'

La sonda específica del gen *CG11874* (posible off-target de las líneas de ARNi de *dsparc*) fue generada usando los siguientes cebadores:

CG11874 **Sp6**:

5'ATTAGGTGACACTATAGAAGAGATGGAGAAGCGAACTCAGCGG 3'

CG11874 **T7**:

5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGTATCCAATGAGTCAACAATGG 3'

Cebadores para generar la sonda para detectar la expresión de *fwe*^{LoseA}:

fwe^{LoseA} **Sp6**:

5'ATTAGGTGACACTATAGAAGAGGCTTCTCGAGAGGACATGG 3'

fwe^{LoseA} **T7**:

5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCCAGACATCGG 3'

Las larvas fueron diseccionadas en hielo en 1xPBS estéril filtrado. Se fijaron en formaldehído 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de cinco lavados de 5 minutos cada uno con PBT frío filtrado (0,4% Tween20 en 1xPBS) a temperatura ambiente, las larvas diseccionadas se incubaron durante 10 minutos en tampón de hibridación (50% de formamida, 5x SSC, 100µg/mL heparin a, 100 µg/mL de ADN de esperma de salmón y 0,1% Tween-20) diluido 1:1 con PBT, seguido por un tratamiento de pre-hibridación con tampón de hibridación durante 1-2 horas a 56°C. Todas las soluciones que contuvieran el tampón de hibridación (salvo la solución de hibridación con sonda) fueron filtradas a través de filtros µm de 0,2 calentadas durante 5 minutos a 99°C, posteriormente enfriadas en hielo durante 5 minutos más y mantenida a 56°C antes de su uso. Las soluciones con sonda para las hibridaciones in situ fueron calentadas a 80°C durante 3 minutos, con la intención de preservar la integridad de la sonda de ARN. La reacción de hibridación fue llevada a cabo usando 500 ng de sonda de ARN marcada con DIG durante 32-48 horas. Posteriormente se realizaron dos lavados en tampón de hibridación durante 10-20 minutos a 56°C porque rehidrata y la reduce de los niveles de isocitrato. Se hicieron lavados en tampón de hibridación diluido al 75%, 50% y 25% en PBT durante 20 minutos cada uno.

Una vez rehidratadas, las muestras fueron lavadas 5 veces en tampón de lavado (0.4% de Tween-20 en 1xPBS) y bloqueadas durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo (0.4 % Tween-20 y 1% BSA en 1xPBS). Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-DIG (generado en ratón, Jackson) para detectar las sondas, diluido 1:1000, y anti-GFP (generado en conejo, Invitrogen) diluido 1:200. La incubación con los anticuerpos primarios fue llevada a cabo en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. La señal procedente de la sonda fue amplificada mediante el uso de un anticuerpo biotinilado anti-ratón (generado en cabra, Invitrogen) diluido 1:250, y posteriormente fue revelado usando el sistema de amplificación de señal de tiramida conjugado al fluoróforo Alexa546 (Invitrogen). La presencia de los clones de células GFP fue revelada a través

de la adición de anticuerpo que reconoce antígenos de conejo conjugado al fluoróforo Alexa488 (Invitrogen).

4. *Drosophila* transgénicas generadas

El ADN complementario (ADNc) perteneciente a *dsparc* procedente de la correspondiente EST (Expressed Sequence Tag RH45818 procedente de DGRC), fue secuenciado y subclonado dentro del vector de expresión inducible *pUASp* usando cebadores modificados que contenían la secuencia de diana de restricción de KpnI en el extremo 5' y cebadores modificados con la secuencias diana de restricción de la enzima XbaI en los extremos 3'.

Con el propósito de generar proteínas recombinantes marcados por el epítipo de hemoaglutinina (HA) en su extremo C-terminal, los mismos cebadores fueron modificados en el extremo 3' incluyendo las secuencias correspondientes al epítipo HA y clonados según las mismas estrategias referidas más arriba. Posteriormente, las construcciones génicas obtenidas fueron enviadas a BestGene para microinyectar en embriones de moscas, generar los stocks que fueron seleccionados y balanceados. Se obtuvieron inserciones en el cromosoma 2 balanceados sobre CyO y en el cromosoma 3 balanceados sobre TM3.

5. Estirpes de *Drosophila melanogaster*

Todos los stocks fueron mantenidos empleando condiciones y procedimientos estándar. Una descripción detallada de alelos mutantes, marcadores genéticos y balanceadores cromosómicos usados en este trabajo se puede encontrar en www.flybase.org. Las estirpes utilizadas proceden de *Bloomington Stock Center*, excepto las indicadas.

Todas las líneas de mosca utilizadas proceden de *Bloomington Stock Center*, excepto en las que se indica su procedencia:

ywhs-FLP; FRT82B ubi GFP-nls M(3L) Rps3

ywhs-FLP; FRT82B arm-lacZ/TM6b

ywf; tub>dmyc>Gal4/CyO; UAS-GFP/TM6b (Moreno y Basler 2004)

tub-Gal4 UAS-GFP/FM7; ubi Gal80FRT40/CyO

Igf⁴ FRT40/ CyO (Allen Shearn)
ywhsf; FRT40 ubi GFP/CyO
pten¹⁰⁰ FRT40/CyO (Oldham y Hafen 2003)
UAS-lacZ II
UAS-p35/TM6b (Hay y cols. 1994)
UAS-dIAP1 brk-Z/TM6b (Moreno y cols. 2002)
ywf; UAS dpp-GFP dpp^{d8}/CyO (Ruperte 1995)
w;UAS-wg-HA (Zecca y cols. 1996)
yw;UAS-InR exel
w;H2Av-GFP Df(3R)nm136 (Martinek y cols. 2008)
ap-Gal4 UAS-GFP/ CyO
UAS-dsparc/CyO
ywf;Sp/CyO; ubi-GFP FRT80B/TM6b
fwe²⁰² FRT80B/TM6b (Rhiner y cols. 2010)
ywf; sp/CyO; Pact>y>Gal4 UAS-GFP/TM6b (Richard Mann)
UAS-brk (Campbell)
UAS-hep^{CA} (H. Steller)
w;UAS-HA-egr (M. Miura)
UAS-fwe^{Lose-A} (Rhiner y cols. 2010)
UAS-fwe^{Lose-B} (Rhiner y cols. 2010)
UAS-hid (H. Steller)
en-Gal4 UAS-GFP/CyO
da-Gal4
gmr-Gal4 UAS-egr/CyO (Moreno y cols. 2002)
UAS-puc (Martín-Blanco y cols. 1998)
UAS-bsk^{DN} (H. Steller)
UAS-rab5 (Entchev y cols. 2000)
gmr-Gal4
esg-Gal4 UAS-GFP
arm-Gal4 II
arm-Gal4 III
dII-Gal4 UAS-GFP

nub-Gal4

P{w⁺ gen res [YFP/GFP/RFP]-22-1-2} (Yao y cols. 2009)

ywf, Pact>CD2>Gal4 UAS-GFP; Gal80^{ts}/TM6b

5.1. Líneas de *Drosophila* con construcciones de *ARNi*

Todas las líneas de moscas *ARNi* utilizadas proceden de VDRC (Vienna Drosophila RNAi Center):

UAS-RNAi fwe (ID 39596, Cr 2, viable), *UAS-RNAi fwe* (ID 104993, Cr 2, viable), *UAS-RNAi egr* (ID 45253, Cr 3, viable), *UAS-RNAi dsparc* (ID 16677, Cr 2, viable), *UAS-RNAi dsparc* (ID 16678, Cr 3, viable), and *UAS-RNAi dsparc* (ID 100566, Cr 2, viable), la efectividad de estos *ARNi* se ha publicado previamente (Martinek, 2008). Se sobreexpresaron los *ARNi-dsparc* utilizando el promotor *da-Gal4* y se observó letalidad embrionaria y los mismos defectos neurales que se observan en los embriones mutantes de *dSparc*.

Se cruzaron hembras *ap-Gal4 UAS-GFP* con machos *UAS-RNAi dsparc crIII* y *UAS-dsparc*. Las larvas se diseccionaron cuando llegaron al estadio de larva 3.

5.2. Detalle de las líneas de *Drosophila* utilizadas en cada experimento

Para generar clones silvestres en discos *M/+*, se cruzaron hembras del genotipo *ywhs-FLP; FRT82B arm-lacZ* con machos *ywhs-FLP; FRT82B ubi GFP-nls M(3L) Rps3* y las larvas se incubaron 15 minutos a 37°C y fueron diseccionadas 48h después.

Para generar clones silvestres en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* se cruzaron hembras del genotipo *yw hsp70-flp; tub>dmyc>Gal4; UAS-GFP* con machos *UAS-lacZ*, las larvas fueron sometidas a un choque térmico a 37°C durante 15 minutos. Se mantuvieron a 25°C y fueron diseccionadas 24, 48 y 72 horas después del choque térmico.

Para detectar la expresión endógena de *dsparc* se utilizó el stock *w FRT18a* como silvestre y el stock *yw hsp70-flp; tub>dmyc>Gal4; UAS-GFP*.

Para obtener clones *Igf^{-/-}* clones se cruzaron hembras de genotipo *ywf, tub-Gal4 UAS-GFP/FM7; ubi Gal80 FRT40* con machos *Igf⁴ FRT40*.

Para obtener clones *pten^{-/-}* se cruzaron hembras de genotipo *ywhsf; FRT40 ubi GFP* con machos *pten¹⁰⁰ FRT40*. Las larvas fueron sometidas a un choque térmico de 60 minutos a 37°C y fueron diseccionadas 24 y 48h después.

Para los experimentos de epistasis y rescate de competición celular se cruzaron hembras de genotipo *yw hsp70-flp; tub>dmyc>Gal4; UAS-GFP* con machos *UAS-lacZ (II), UAS-dsparc, UAS-p35, UAS-dIAP1 brk-Z, ywf; UAS-dpp-GFP dpp^{d8}, w;UAS wg-HA, yw;UAS-InR exel, UAS-puc, UAS-bsk^{DN}, UAS-RNAi egr, UAS-rab5, y w;H2Av-GFP Df(3R)nm136*. Se indujeron clones por choque térmico, 15 minutos a 37°C. Las larvas se mantuvieron a 25°C y fueron diseccionadas 24, 48 y 72 horas después del choque térmico.

Para generar clones *fwe^{-/-}* se cruzaron hembras de genotipo *ywf; ubi-GFP FRT80B*, con machos *fwe²⁰² FRT80B*. Las larvas fueron sometidas a un choque térmico de 60 minutos a 37°C para inducir recombinación mitótica y fueron diseccionadas 72h después.

Para generar clones silvestres que expresaran *brk, hid, hep^{CA}, HA- egr, UAS p53^{DN}, fwe^{Lose-A} y fwe^{Lose-B}* en un fondo de células silvestres, se cruzaron hembras de genotipo *ywf; Pact>y>Gal4 UAS-GFP* con machos *UAS-brk, UAS-hep^{CA}, w;UAS-HA-egr, UAS-fwe^{Lose-A} y UAS-fwe^{Lose-B}*. Hembras de genotipo *UAS-hid* se cruzaron con machos *ywf; Pact>y>Gal4 UAS-GFP*. Las larvas fueron sometidas a un choque térmico de 7 minutos a 37°C y fueron diseccionadas 24, 48 y 72h después.

Hembras de genotipo *ywf, Pact>CD2>Gal4 UAS-GFP; Gal80^{ts}* fueron cruzadas con machos *UAS-hid*. Fueron sometidos a un choque de calor a 37°C durante 12 minutos después de dos días de la puesta del huevo. Las larvas se mantuvieron a 17°C durante 3 días. Después se cambiaron a 29°C para inactivar el *Gal80^{ts}* durante 24h y se diseccionaron.

Se cruzaron hembras de genotipo *gmr-Gal4 UAS-egr* con machos *UAS-lacZ*, *UAS-dsparc*, *UAS-dIAP1*, *UAS-RNAi egr* y se cuantificó el tamaño del ojo de las moscas adultas utilizando *Image-J A 1.44a*.

Se cruzaron hembras de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP* con machos *UAS-lacZ*, *UAS-p35*, *UAS-dsparc* para los experimentos de rotación de la genitalia de los individuos adultos.

Se cruzaron hembras de genotipo *ap-Gal4 UAS-GFP* con machos *UAS-lacZ*, *UAS-dsparc*, *UAS-dIAP1* y se diseccionaron los individuos cuando llegaron a larva III.

Pupas de *P{w⁺ gen res [YFP/GFP/RFP]-22-1-2}* se diseccionaron 48h después de la formación del pupario.

Se cruzaron hembras de genotipo *gmr-Gal4* con machos *UAS-lacZ*, *UAS-p35*, *UAS-dsparc*, *UAS-RNAi fwe*, se recolectaron las pupas y se diseccionaron 48h después de la formación del pupario.

6. Cultivos celulares y experimentos de activación de dSparc

Para los experimentos de cultivos celulares se utilizaron células Schneider 2 que fueron derivadas de un cultivo primario de embrión de *Drosophila* tardío (20-24h) (Schneider 1972). 1.5×10^6 Células S2 fueron transfectadas con 0.2µg ADN del plásmido *pUASp-dsparc-HA* utilizando SuperFect (QIAGEN). El plásmido se transfectó junto con el plásmido *act>Gal4*. El plásmido *act>Gal4* permite la transactivación constitutiva de cualquier secuencia que se encuentra tras una secuencia *UAS*. Las células S2 co-transfectadas con ambas construcciones (*act>Gal4* y *UASp dsparc*) se tiñeron contra HA para comprobar la expresión de dSparc en estas células de cultivo. El vector *pUASp-GFP* se utilizó como control. Las células fueron tratadas con PBS/NaCl 150mM/ Tritón 1% para extraer proteínas.

Para los experimentos de *serum deprivation* y *killing signal (KS)*, las células se cultivaron en medio Schneider (Sigma) 10% suero fetal bovino y antibióticos (penicilina y estreptomicina) en pocillos de 25 cm³ durante 24 horas. El medio fue sustituido por medio sin suero y las células se mantuvieron en estas condiciones durante 24-48h. Después se recogió en sobrenadante y

se complementó con 10% de suero, a esta mezcla la denominamos KS-medium.

Para immunostaining, las células transfectadas se fijaron y después se tiñeron con anti-dSparc hecho en ratón (1: 10) o anti-HA hecho en rata (1:500) (Roche) y anticuerpos secundarios unidos a un fluoróforo (1:250; Invitrogen). Faloidina acoplada a un fluoróforo Alexa 488 (1:200). Las células se montaron en Vectashield con DAPI.

Para los western-blots, utilizamos geles NuPAGE Bis-Tris 4-12% (Invitrogen), y los siguientes anticuerpos primarios: anti-HA hecho en rata (1:5000) (Roche), anti-tubulina hecho en ratón (1:1000000) (Sigma), anti-dSparc hecho en conejo (1:5000). Anticuerpos secundarios anti-rata Alexa 680, anti-ratón Alexa 680, anti-ratón Alexa 800, anti-conejo Alexa 680 (1:2000) (hechos en cabra, Invitrogen). Las imágenes fueron adquiridas utilizando ODYSSEY infrared imaging system y ODYSSEY software versión 2.0.40 de LICOR Biosciences.

7. Inmunofluorescencia

Las larvas se diseccionaron en PBS en hielo durante 20 minutos y se fijaron en 4% de formaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se permeabilizaron en PBT 0,4%+BSA 1% (PBS1x, Tritón 0,4%, BSA 1%) con 1 lavado de 20 minutos. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche. A continuación se lavaron 2 veces durante 20 minutos, se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforos (Alexa 488, 555 o 647) durante toda la noche (en oscuridad), y posteriormente se lavaron 2 veces durante 20 minutos la primera con PBT 0,4% y la segunda con PBS1x. Para preservar la fluorescencia, los tejidos teñidos se montaron en *Vectashield* con *DAPI* (*Vector Laboratories, Inc*).

8. Anticuerpos

Se generó un anticuerpo monoclonal de ratón contra el péptido EAETNNSRRWSNAAVWKWC de dSparc mediante métodos estándar. (Unidad

de Anticuerpos Monoclonales, CNIO). Este anticuerpo ha sido utilizado a una dilución de 1:10. Anti-dSparc (hecho en conejo, 1:500 (Martinek y cols. 2008)). Anti-conejo biotinilado (1:200), Anti-ratón biotinilado (1:200) (Invitrogen). La señal se amplificó con un kit de Tiramida Alexa 546 (Invitrogen).

Anti-GFP (hecho en conejo, 1:200 Invitrogen)

Anti-GFP (hecho en ratón, 1:200 Roche)

Anti-C3^{activado} (hecho en conejo, 1:50 Cell Signalling Technology)

Anti-Wingless (hecho en ratón, 1:50 Developmental Hybridoma Bank)

Anti-HA (hecho en rata, 1:500 en discos imaginales y 1:100 en células Roche)

Anti-dMyc (hecho en cobaya, 1:500 cedido por G. Morata)

Anti-pMad (hecho en conejo; 1:400 cedido por G. Morata)

Los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos utilizados son: Anti-ratón Alexa 488, Anti-ratón Alexa 555, Anti-conejo Alexa 488, Anti-conejo Alexa 546, Anti-rata Alexa 647, Anti-cobaya Alexa 546 (1:200) (hechos en cabra, Invitrogen).

9. Restricción de dieta

Papilla normal: Agua: 84,3%, levadura (Salf-instand) 4,7%, glucosa (Panreac) 6,1%, agar (conda, pronadisa) 0,7%, harina de trigo (Pasty Line) 2,07%, harina de soja (panadería Rincón del Segura) 0,93%, ácido propiónico (Sigma) 0,26%, metil 4-hidroxibenzoato 10% (Sigma) 0,94%.

Papilla restrictiva 50%: Agua 91,79%, levadura (Salf-instand) 2,35%, glucosa (Panreac) 3,05%, agar (conda, pronadisa) 0,7%, harina de trigo (Pasty Line) 1,04%, harina de soja (panadería rincón el Segura) 0,46%, ácido propiónico 0,14%, metil 4-hidroxibenzoato 10% (Sigma) 0,47%.

10. Retinas pupales

Se recolectaron prepupas blancas (tiempo cero) y se mantuvieron a 25°C durante 48h en una placa de petri húmeda. Se diseccionaron en PBS 1x frío para extraer las retinas y se tiñeron con naranja de acridina 5µg/ml durante 15 minutos. Después de un lavado de 10 minutos las retinas se montaron en PBS1x y se examinaron inmediatamente en el microscopio confocal.

11. Análisis experimental y cuantificaciones

Las áreas ocupadas por clones GFP positivos y el área de la bolsa alar fueron cuantificadas utilizando Metamorph 7.0 (Molecular Devices). El promedio y la desviación estándar de estos datos fueron calculados para cada tiempo (24, 48 y 72h). Todas las barras de error representan el error estándar.

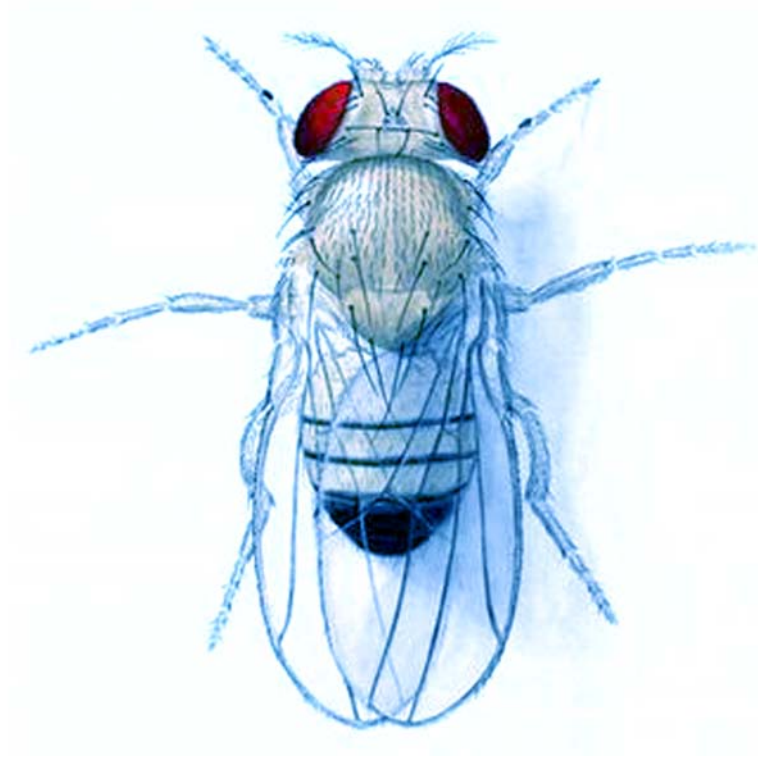
12. Análisis estadísticos de datos

Los datos procedentes de las cuantificaciones de los diferentes experimentos fueron analizados estadísticamente utilizando una T-Student. Para su análisis de frecuencias y estadísticos, todos los datos fueron introducidos en el programa informático Microsoft Excel. Las gráficas fueron generadas mediante los programas informáticos Microsoft Excel y Adobe photoshop CS4 *version 11*.

13. Toma y análisis de imágenes

Todas las imágenes fueron capturadas usando un microscopio confocal *LEICA TCS-SP2-AOBS* o *LEICA TCS SP5* (Leica Microsystems) y fueron editadas usando *Adobe photoshop CS4 version 11*.

RESULTADOS



1. Selección de posibles marcadores específicos de competición celular.

Para buscar marcadores específicos de competición celular, se diseñó una estrategia para estudiar los cambios de expresión de genes de *Drosophila melanogaster* en competición celular.

Se utilizó el sistema de competición celular por inducción de clones silvestres en un tejido con niveles elevados de dMyc (Moreno y Basler 2004). La construcción génica *tub>dmyc>Gal4* permite la generación de clones de células silvestres por eliminación del transgén *dmyc* que está flanqueado por las dos secuencias *FRT* (*Flipase Recognition Target*, sitio de reconocimiento de Flipasa). Dicha eliminación tiene lugar gracias a la actividad de la Flipasa (proteína recombinasa de levaduras). La expresión de esta *flipasa* está dirigida por el promotor inducible de la proteína Hsp70 (*heat shock protein 70*). De tal forma que el número de clones de células silvestres (*tub>Gal4*) se controla con la temperatura y del tiempo al que se sometan los animales al choque térmico.

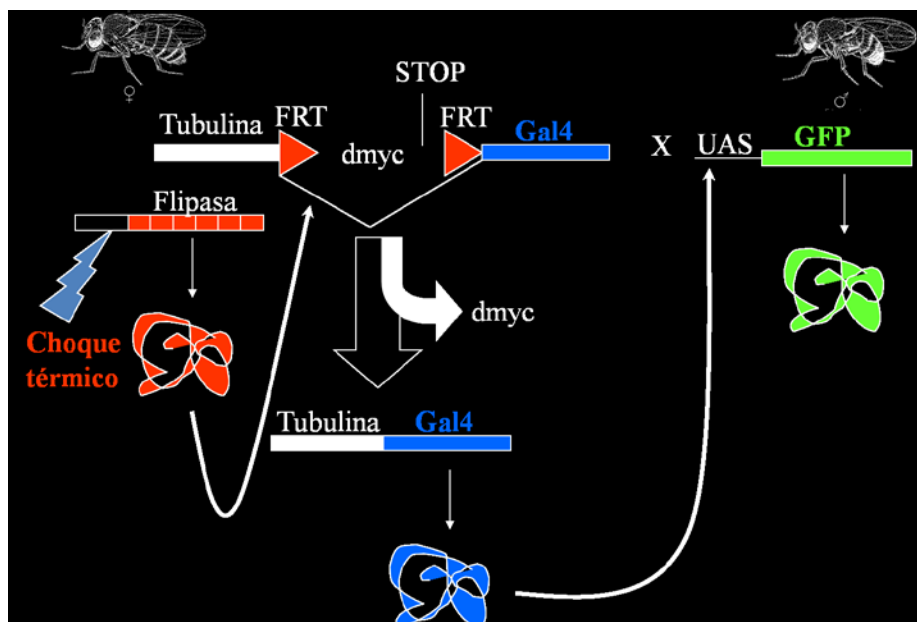


Figura 15. Esquema del sistema de competición celular por inducción de clones silvestres en un fondo de tejido con niveles elevados de dMyc. Se cruzan moscas *UAS-GFP* con moscas que llevan la *flipasa* con un promotor de choque térmico y una construcción que lleva el promotor de la tubulina, un cassette *dmyc* flanqueado por dos secuencias *FRT* y un codón de parada al final, y *Gal4*. Cuando los individuos se someten a un choque térmico la

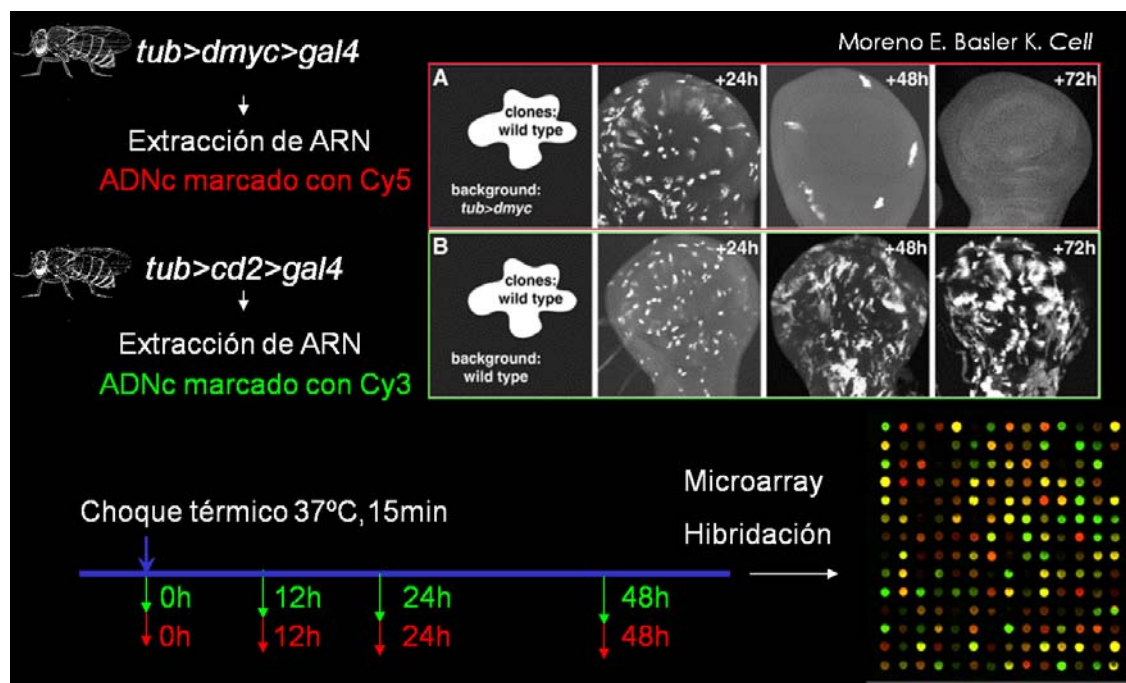
Flipasa reconoce los sitios *FRT*, se elimina *dmyc*, se expresa Gal4 que se une a la secuencia *UAS* y se expresa GFP. Se obtienen células silvestres marcadas en verde en un fondo de células que sobreexpresan *dmyc*.

Las células que hayan eliminado el transgén de *dmyc*, comienzan a expresar la proteína Gal4 (factor de transcripción de levaduras), que reconoce la secuencia *UAS* (*Upstream Activating Sequence*) y se empieza a expresar GFP (*Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente) (Brand y Perrimon 1993). La expresión de esta proteína fluorescente marca los clones de células silvestres, de este modo se pueden observar los clones silvestres durante la competición celular (Figura 15).

Como experimento control, usamos larvas transgénicas con la construcción *tub>Cd2>Gal4*, que permite generar clones *tub>Gal4* en un fondo silvestre. En estas muestras control, donde no se genera competición, se inducen clones de células silvestres marcadas por la expresión de GFP en fondo de células silvestres marcadas por la expresión de la proteína Cd2 (proteína de membrana procedente de rata). Para analizar cambios en los perfiles de expresión durante competición celular de los genes de *Drosophila*, se cruzó cada línea de moscas experimental (*tub>dmyc>Gal4*) y control (*tub>Cd2>Gal4*) con moscas que poseían un transgén inducible de la β -galactosidasa (*UAS-lacZ*). La extracción de ARN total de ambos tipos de discos imaginales de ala procedentes de individuos en estadio de larva III se realizó por triplicado. Las muestras de ARN total extraídas de discos imaginales en competición celular (*tub>dmyc>Gal4*) y de discos imaginales control (*tub>Cd2>Gal4*) a diferentes tiempos (0, 12, 24 y 48 horas tras la inducción de clones) fueron marcadas con diferentes fluoróforos (Cy5 y Cy3) a fin de generar una señal semicuantitativa y específica en función del cambio en los niveles de expresión de estos genes en cada tiempo. Este cambio en los niveles de expresión fue detectado, al hibridar cada pareja de muestras (control y experimento) con microarrays de BDGRC, y obtener una señal única.

Los datos procedentes de la lectura de los microarrays fueron analizados con el programa de análisis STEM (Ernst y cols. 2005) que permite clasificar los genes según perfiles de cambio de expresión preestablecidos, analizando

tanto los niveles de expresión como la bondad de ajuste de dichos perfiles (Figura 16).



Los datos fueron normalizados según valores experimentales a 0h, eliminándose así los genes regulados directamente por la expresión de dMyc independientemente de competición celular. Además, el propio diseño experimental también eliminaba aquellos genes cuya expresión dependiera de la inducción clonal por choque térmico, ya que ambas muestras (control y experimento) fueron tratadas de igual forma en base a este parámetro. El estudio se centró en el análisis de los genes cuya expresión aumentaba a tiempos tempranos durante la competición celular, de este modo evitamos genes involucrados en procesos de muerte celular de las células perdedoras. Una vez normalizados, analizados y clasificados los datos experimentales, se procedió a la validación de los genes resultados con perfiles elevada expresión durante los estadios más tempranos de competición como posibles marcadores de competición. Dentro de los genes destinados a estudio se prestó especial atención a aquellos genes de función desconocida, de carácter extracelular o integrantes de la membrana citoplasmática por su capacidad potencial de mediar en procesos de comunicación célula-célula durante la competición

celular. Además, fueron objeto de especial interés aquellos genes con potencialidad de modificar el comportamiento de las células, tales como factores de transcripción, proteínas que pudieran actuar como receptor o transductor de señales, o involucradas en procesos de señalización de estrés celular como liberación de iones de calcio.

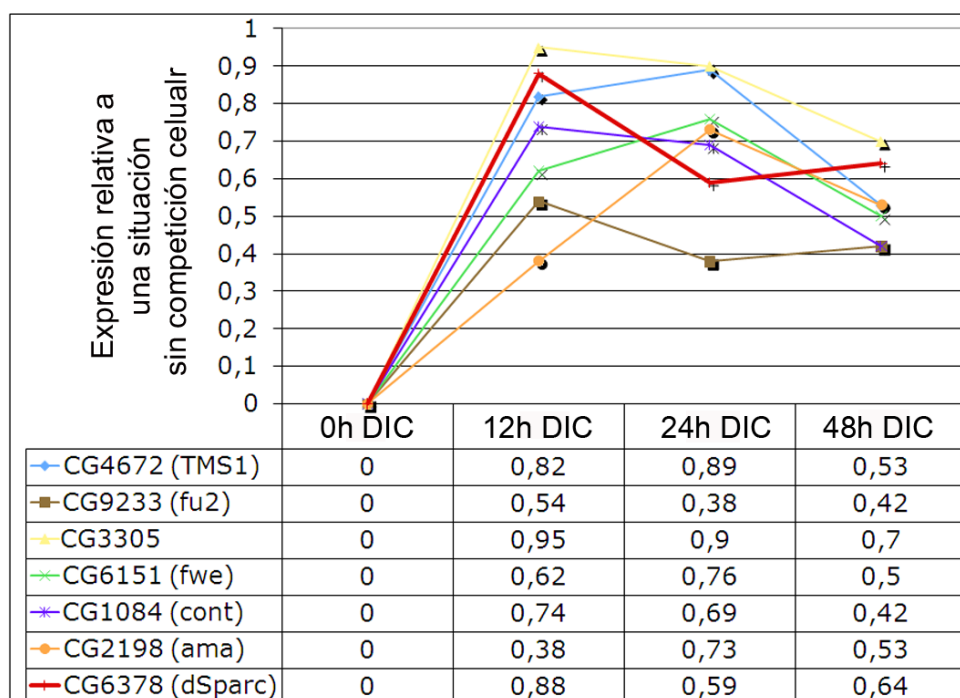
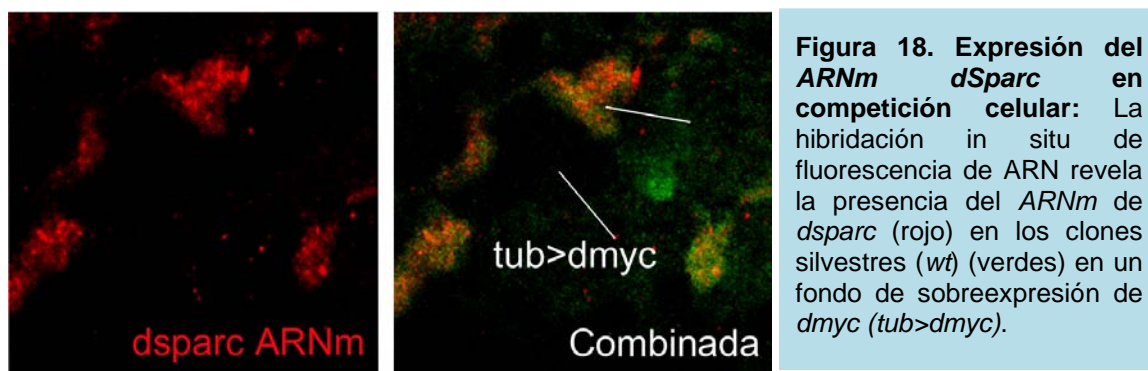


Figura 17. Análisis de expresión génica mediante microarrays para identificar marcadores de competición celular: El perfil transcripcional de los discos imaginales donde se indujo competición celular fue comparado con muestras control sin competición celular. Entre los genes expresados diferencialmente se seleccionó *dsparc* (Línea roja).

Entre los genes que se expresaban diferencialmente durante la inducción de la competición celular, se seleccionó *CG6378 (dsparc)* para este estudio porque se ajustaba a un perfil en el que se incrementaba su expresión a tiempos tempranos durante la competición celular (Figura 17) y da lugar a una proteína de carácter extracelular (tiene un péptido señal).

2. Validación de dSparc como posible marcador de competición celular.

Para validar los resultados del microarray se utilizó la hibridación in situ de fluorescencia de ARN (FISH-RNA) que además permite determinar en qué tipo de células (supercompetidores o células perdedoras) se presentan las variaciones de expresión génica, así como cual es el perfil de expresión de los marcadores a lo largo del disco imaginal de ala en un momento determinado de la competición celular. *dsparc* fue validado como posible marcador específico de competición celular ya que presentaba un aumento de expresión exclusivamente en células perdedoras (GFP silvestres) 48 horas después de la inducción de la competición celular (Figura 18).



dsparc es el marcador de competición celular más fiable que hemos encontrado, puesto que la expresión diferencial de los componentes *downstream* de la vía Dpp como pMad o Brinker son difíciles de detectar (Moreno y Basler 2004) y la activación de caspasa ocurre solo en algunas células en los últimos estadios de competición celular (Moreno y Basler 2004; Baker y Li 2008). *dSparc* incrementa su expresión tempranamente, a partir de 12h después de la inducción de clones.

3. Detección de dSparc: Anticuerpo específico.

Para continuar el estudio del papel de *dSparc* como marcador específico de competición celular se generó un anticuerpo contra un péptido presente en

la proteína dSparc. La secuencia de la proteína dSparc (Figura 19) consta de un péptido señal, un dominio ácido, un dominio tipo folistatina y un dominio extracelular de unión a calcio (Martinek y cols. 2002).

```

MRSIWLLLGLGLLAVSHVQASTEFSEDLLDEDLDSLIDENEEFLRLLEEKNKIKDIERENEIATKLAEVQHNL
NPVVEVDLCETMSCGAGRICQMHDEKPKCVCIPECPEEVDTRRLVCTNTNETWPSDCSVYQQRWCDSGEPGCTNP
DNAHMHIDYYGACHEPRSCGEDLKDFFRRMRDWLFNVMRDLAERDELTEHYMQMELEAETNNSRRWSNAAVWKWC
DLGDGTDTRSRSRHELFFIRAPLVSLHEHCIAPFLESCDSNKDHRITLVEWGACLELDPEDLKERCDVQRAQPHLLG
  
```

Figura 19. Secuencia de aminoácidos y dominios de dSparc. El péptido señal se representa en rojo. El dominio N-terminal ácido está marcado en amarillo. El dominio tipo folistatina se muestra marcado en azul. El dominio de unión extracelular a calcio está marcado en naranja claro. El péptido reconocido por el anticuerpo se representa en verde.

Se comprobó la especificidad del anticuerpo expresando un *ARNi* específico contra *dsparc* (Ver materiales y métodos), en el compartimento dorsal del disco imaginal de ala. Se observó que desaparecía la tinción endógena de dSparc (Figura 20).

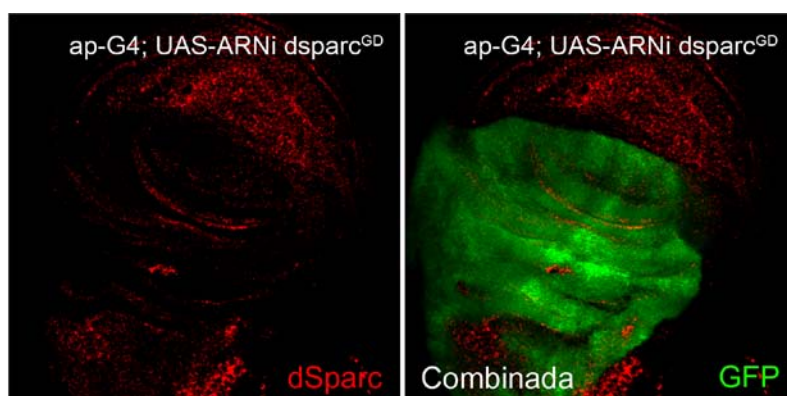


Figura 20. Especificidad del anticuerpo contra dSparc: Reducción de la proteína dSparc (rojo) en el compartimento dorsal (verde).

4. dSparc incrementa su expresión en las células perdedoras durante la competición celular.

Para evaluar la expresión de dSparc se realizaron experimentos en diferentes escenarios de competición celular.

En primer lugar se utilizó la técnica *Minute* en la que se enfrentan células “perdedoras” *M/+*, que son mutantes heterocigotas para un gen que da lugar a una proteína ribosomal, con células silvestres (*wt*) “ganadoras” (Morata y Ripoll 1975; Simpson 1979). Los discos imaginales formados completamente por

células silvestres (Figura 21A) o *M/+* (Figura 21B), es decir, en ausencia de competición, expresan niveles comparables y homogéneos de dSparc. Sin embargo, los clones *M/+* perdedores que están en el mismo disco junto a células silvestres, tienen mayores niveles de dSparc que las células silvestres (Figura 21C-D).

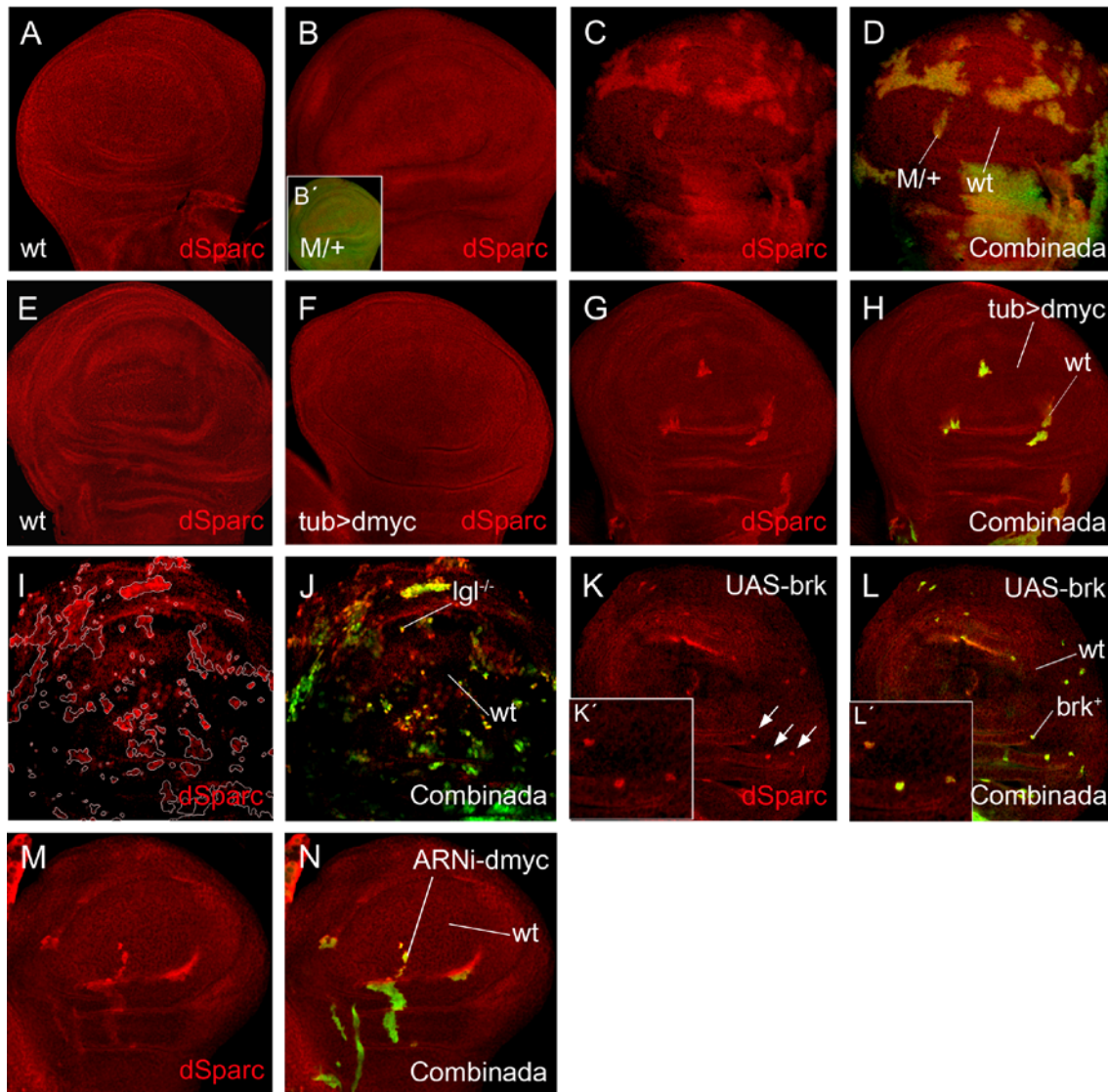


Figura 21. Las células perdedoras aumentan la expresión de dSparc durante la competición celular. (A-B) Discos control compuestos por células silvestres (*wt*) (A) o *Minute* heterocigóticas (*M/+*) (B) muestran niveles uniformes de dSparc (rojo). (C-D) Clones *M/+* silvestres en un fondo *M/+*. dSparc (rojo) incrementa su expresión en las células *M/+* (verde). (E-F) Discos control silvestres (E) y *tub>dmyc* (F) muestran una expresión uniforme de dSparc (rojo). (G-H) Clones silvestres (verde) en un fondo *tub>dmyc* aumentan la expresión de dSparc (rojo). (I-J) Clones mutantes *lgl^{-/-}* (verde) muestran un incremento de expresión de dSparc (rojo). (K-L) Clones que sobreexpresan *brk* (perdedores, verde) en un fondo de células silvestres, aumentan la expresión de dSparc (rojo). (M-N) Clones de células en los que se inhibe parcialmente la expresión de *dmyc* utilizando un *ARNi-dmyc* (verde) en un fondo de células silvestres, muestran un incremento de expresión de dSparc (rojo).

A continuación probamos la expresión de dSparc en un ensayo de supercompetición: se había demostrado previamente que oncogenes de la familia *myc* (el homólogo en *Drosophila* es *dmyc*) podían transformar las células en supercompetidoras (de la Cova y cols. 2004; Moreno y Basler 2004), es decir, capaces proliferar a costa de las células silvestres que las rodean, eliminándolas por apoptosis. Las células silvestres (*tub>Gal4*) se generan junto a células que sobreexpresan *dmyc* (*tub>dmyc*) mediante una flipasa inducible por choque de calor que reconoce un cassette de *dmyc* flanqueado por dos sitios *FRT* en moscas transgénicas *tub>dmycSTOP>Gal4; UAS-GFP*. Como resultado, las células silvestres están marcadas con GFP ya que el transgen *UAS-GFP* se activa por la unión del factor de transcripción Gal4. Se analizó la expresión de dSparc en discos compuestos en su totalidad por células silvestres o *tub>dmyc* y se detectaron niveles homogéneos bajos de dSparc (Figura 21E-F). Sin embargo, en discos donde se generaron clones de células silvestres en un fondo de sobreexpresión de *dmyc*, dSparc incrementa su expresión en los clones de células silvestres (Figura 21G-H).

Por otro lado, realizamos un experimento en un tercer escenario de competición celular: los clones “*letal-giant-larvae*” (*Igf^{+/−}*) se comportan como células perdedoras cuando se mezclan con células silvestres (Hariharan y Bilder 2006). En este caso la expresión de dSparc también aumenta en las células perdedoras *Igf^{+/−}* (Figura 21I-J).

Luego se analizó la expresión de dSparc en otro entorno de competición celular, donde células que sobreexpresan *brinker* se comportan como células perdedoras cuando están rodeadas por células silvestres en la bolsa alar. También en esta situación la expresión de dSparc se incrementaba en las células que sobreexpresaban *brk* (Figura 21K-L).

Finalmente se generaron clones de células en los que se inhibió parcialmente la expresión de *dmyc* (perdedoras), utilizando un *ARNi-dmyc*, en un fondo de células silvestres (ganadoras). También en esta situación la expresión de dSparc se incrementaba en las células que expresaban menos *dmyc* (Figura 21M-N).

Todos estos resultados sugieren que los niveles de dSparc aumentan en células perdedoras que se encuentran en situaciones de competición celular.

5. El incremento de los niveles de dSparc ocurre específicamente durante la competición celular

El aumento de expresión de dSparc podría ser provocado por otras interacciones o situaciones además de la competición celular.

Para comprobar la especificidad de dSparc en competición celular se generaron como control clones *pten*^{-/-} capaces de sobreproliferar pero que no inducen competición celular (de la Cova y cols. 2004; Rhiner y cols. 2009). Las células silvestres que rodean a los clones *pten*^{-/-} no aumentan la expresión de dSparc (Figura 22A-B), sugiriendo que dSparc podría ser específico de competición celular y no un producto de las diferencias en proliferación.

Las células perdedoras son eliminadas por apoptosis dependiente de competición celular, por lo tanto dSparc podría ser un marcador general de apoptosis. Para descartar esta posibilidad, se generaron clones de células que sobreexpresan el gen pro-apoptótico “*head involution defective*” (*hid*) mediante el control del promotor de *actina* en un fondo de células silvestres. Los clones de células que sobreexpresan *hid* son eliminados por apoptosis (Grether y cols. 1995) rápidamente de la bolsa alar y no muestran incremento en la expresión de dSparc (Figura 22C-D). Utilizamos otra aproximación experimental para inducir apoptosis en clones en ausencia de competición celular. La vía “Jun N(amino)-terminal Kinasa” (JNK) transduce señales desde la superficie celular al núcleo o responde a estréses de tipo físico o químico mediante la fosforilación secuencial de una serie de kinasas. La vía JNK se ha implicado en la activación de la maquinaria apoptótica (Kuranaga y cols. 2002; Kanda y Miura 2004). Se sobreexpresó una forma de *hemipterous* (*hep*) constitutivamente activa, que activa la ruta JNK (Glise y cols. 1995; Adachi-Yamada y cols. 1999). Los clones que sobreexpresan *hep* activado en un fondo de células silvestres, son eliminados por apoptosis, en este caso tampoco se observó un incremento en los niveles de dSparc (Figura 22E). *eiger* (*egr*)

induce muerte independientemente de competición celular (Igaki y cols. 2002; Moreno y cols. 2002b). Decidimos generar clones de sobreexpresión de *egr* en un fondo de células silvestres y observamos también que los clones que sobreexpresan *egr* se eliminaban por apoptosis, pero la expresión de dSparc no aumentaba (Figura 22F).

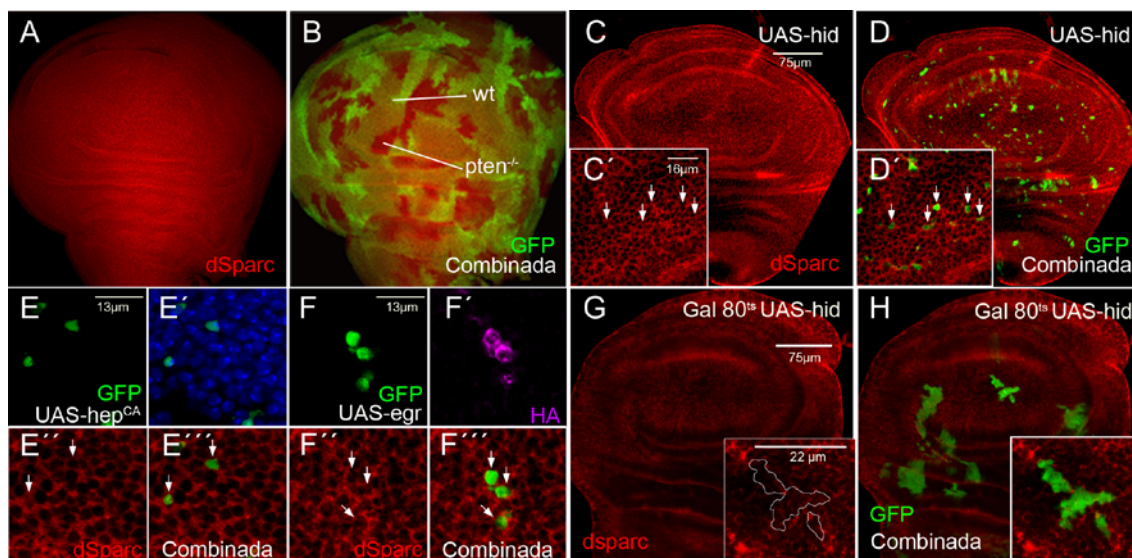


Figura 22. dSparc es un marcador específico de competición celular. (A-B) Células silvestres (*wt*) (verdes) junto a células *pten*^{-/-} (ausencia de verde) no muestran un aumento de los niveles de dSparc (rojo). (C-D) clones de células que sobreexpresan *hid* (verdes) en un fondo de células silvestres no presentan un aumento en la expresión de dSparc (rojo). (E) Clones de células que sobreexpresan *hep*^{CA} (verdes) junto a células silvestres, no muestran un aumento en la expresión de dSparc (rojo). Núcleos marcados con DAPI (azul). (F) Clones de células que sobreexpresan *HA-egr* (verde) en un fondo de células silvestres no muestran un incremento en los niveles de dSparc (rojo). Tinción con anti-HA (magenta) para visualizar los clones que sobreexpresan *egr*. Las flechas marcan la situación de los clones. (G-H) Clones de células que sobreexpresan *hid* (verdes) durante 24h bajo el control de *Gal80*^{ts} en un fondo de células silvestres no muestran un aumento de los niveles de dSparc (rojo).

Puesto que los clones que sobreexpresan *hid* son muy pequeños y se eliminan muy rápidamente, se generaron clones más grandes que sobreexpresaran *hid*. Para ello se utilizó un *Gal80*^{ts} (McGuire y cols. 2003) que a 17°C bloquea la función de Gal4 y por lo tanto impide la sobreexpresión de *hid*. Después de dos días de puesta los individuos son sometidos a un choque térmico para generar los clones y se mantienen a 17°C durante tres días para permitir el crecimiento de los clones. Después se cambian a 29°C, el *Gal80*^{ts} se inactiva y permite la función de Gal4 y por tanto la expresión de *hid* (*UAS-hid*).

Estas células que empiezan a expresar *hid* son eliminadas por apoptosis y no se observan cambios en la expresión endógena de dSparc (Figura 22 G-H). Estos datos sugieren que dSparc es un marcador específico de competición celular y no un marcador general de apoptosis.

6. Análisis de epistasis genética.

Para comprobar si la activación de caspasa es necesaria para la expresión de dSparc, modificamos el ensayo de supercompetición mencionado previamente. Bloqueamos la activación de caspasa específicamente en las células perdedoras (marcadas con GFP) mediante diferentes construcciones: un *UAS-p35* (inhibidor de caspasa procedente de baculovirus) (Hay y cols. 1994), o un *UAS-dIAP1* (Yoo y cols. 2002) (el inhibidor de la proteína de apoptosis 1 de *Drosophila*). La inhibición de la activación de caspasa no tiene efecto en la inducción de dSparc en competición celular (Figura 23A-D), demostrando que la activación de caspasa no se requiere para la inducción de dSparc en células perdedoras.

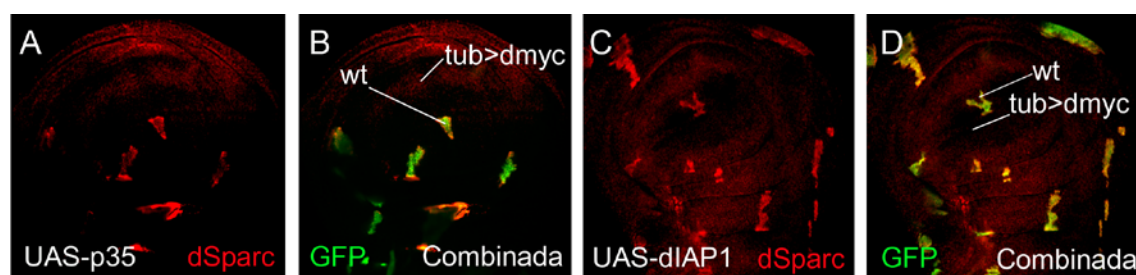


Figura 23. Epistasis I: En el experimento de supercompetición, ni la expresión de p35 (A-B), ni la de dIAP1(C-D) pueden reducir el aumento de expresión de dSparc (rojo) en las células silvestres (*wt*) perdedoras (verde).

Estos resultados son consistentes con las observaciones de que dSparc es un marcador temprano de competición celular que se sobreexpresa en células perdedoras, mientras que la activación de caspasa es un evento tardío detectable solo en unas pocas células en un momento dado.

Se ha publicado que en situaciones de competición celular se activa la vía JNK en las células perdedoras (Moreno y cols. 2002a), por tanto decidimos comprobar si la sobreexpresión de dSparc en las células perdedoras depende de la activación de la vía JNK. Para ello, utilizamos el ensayo de supercompetición y bloqueamos la actividad JNK específicamente en los clones perdedores sobreexpresando *puckered* (*puc*, fosfatasa de la JNK) (Martín-Blanco y cols. 1998), observamos que las células silvestres rodeadas por supercompetidores todavía mostraban elevados niveles de proteína dSparc (Figura 24A-D).

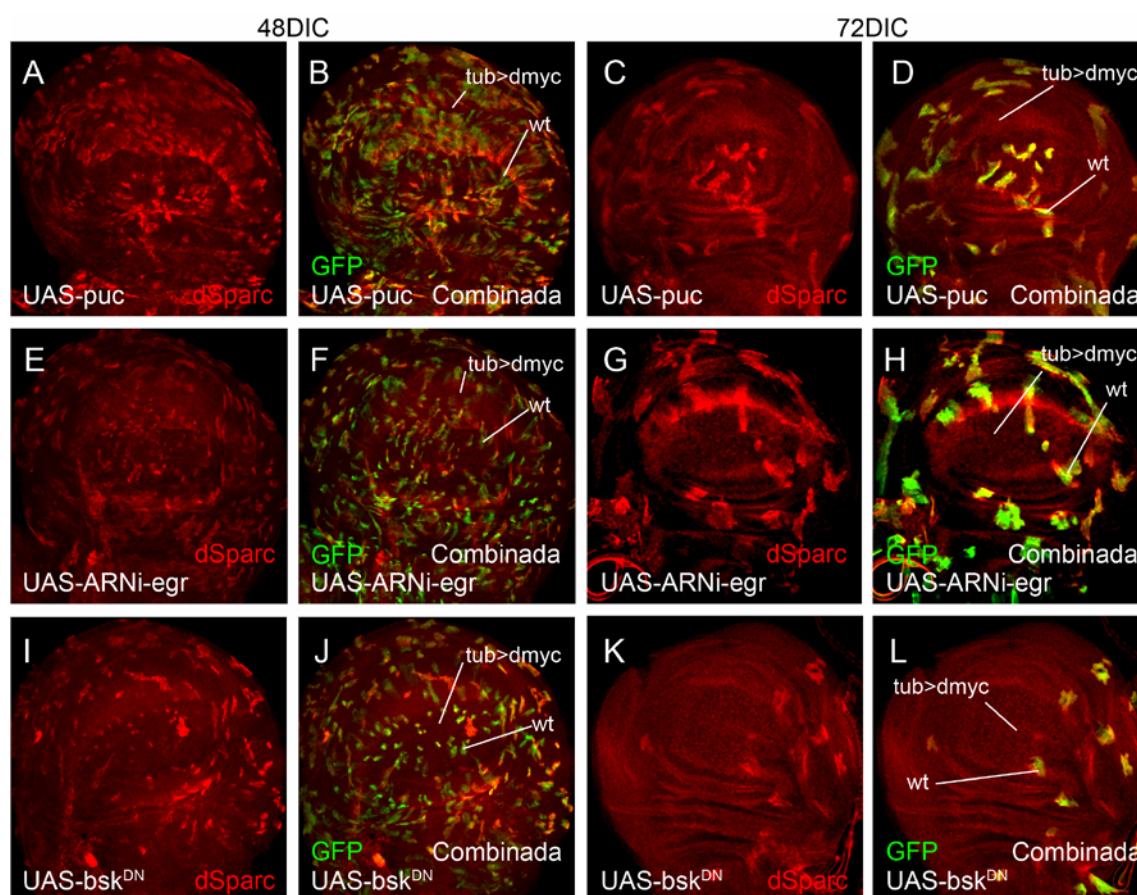


Figura 24. Epistasis II: En el experimento de supercompetición, ni la sobreexpresión de *puc* (A-D), ni la de *bsk^{DN}* (E-H), ni la inactivación de *egr* (I-L) específicamente en los clones perdedores (*wt*) (verde), pueden reducir el incremento de expresión de dSparc (rojo).

Mediante otra aproximación experimental bloqueamos la actividad JNK específicamente en los clones perdedores sobreexpresando un dominante negativo de *bsk* (*basket^{DN}*) (*bsk*, kinasa de la JNK) (Glise 1997) y observamos

que las células silvestres rodeadas por supercompetidores todavía mostraban elevados niveles de proteína dSparc (Figura 24E-H).

Eiger (*egr*), el homólogo en *Drosophila* de la superfamilia TNF (factor de necrosis tumoral), es capaz de inducir la JNK y se activa por desequilibrios en la señalización de Dpp (Moreno y cols. 2002a). Se inactivó *egr* específicamente en las células perdedoras rodeadas por células que sobreexpresaban *dmyc* utilizando un *UAS-RNAi egr* y observamos que dSparc se seguía sobreexpresando en los clones de células perdedoras (Figura 24I-L). La inactivación de la JNK no reprime la sobreexpresión de dSparc aunque sí es capaz de rescatar la eliminación por apoptosis (Moreno y cols. 2002a; Moreno y Basler 2004). Los datos obtenidos en el análisis de epistasis sugieren que el aumento en la expresión de dSparc no depende de *Egr* ni de la activación de la JNK. Además, ni la activación de la JNK ni la activación de *egr* es suficiente para inducir dSparc, puesto que la expresión de *egr* solo no es capaz de inducir la sobreexpresión de dSparc aunque sí que induce la activación de la JNK y apoptosis (Figura 22F).

La estimulación de la endocitosis en células perdedoras es capaz de revertir los déficits de proliferación y supervivencia de éstas células en una situación de supercompetición (Moreno y Basler 2004). Se sobreexpresó en los clones de células perdedoras *rab5* (que es una GTPasa que controla la formación de vesículas de clatrina y su fusión con endosomas tempranos (Bucci y cols. 1992; Zerial y McBride 2001)). Se observó que los clones de células en los que se había estimulado la endocitosis sobreviven mejor en la bolsa alar. A pesar de sobrevivir mejor, estas células siguen expresando elevados niveles de dSparc (Figura 25A-B).

Para estudiar el efecto de los niveles de morfógenos y factores de supervivencia en la expresión de dSparc en situaciones de competición celular, sobreexpresamos estos factores en el ensayo de supercompetición. Las células perdedoras tienen un déficit en estos factores de supervivencia, por ejemplo Dpp, Wingless o el receptor de insulina (InR). Observamos que la sobreexpresión de *dpp* en los clones perdedores reprime significativamente la activación de dSparc principalmente en la bolsa alar (Figura 25C-D). En

cambio, la sobreexpresión de *wg* y el receptor de insulina en células silvestres rodeadas por supercompetidores mostraban elevados niveles de proteína dSparc (Figura 25E-H).

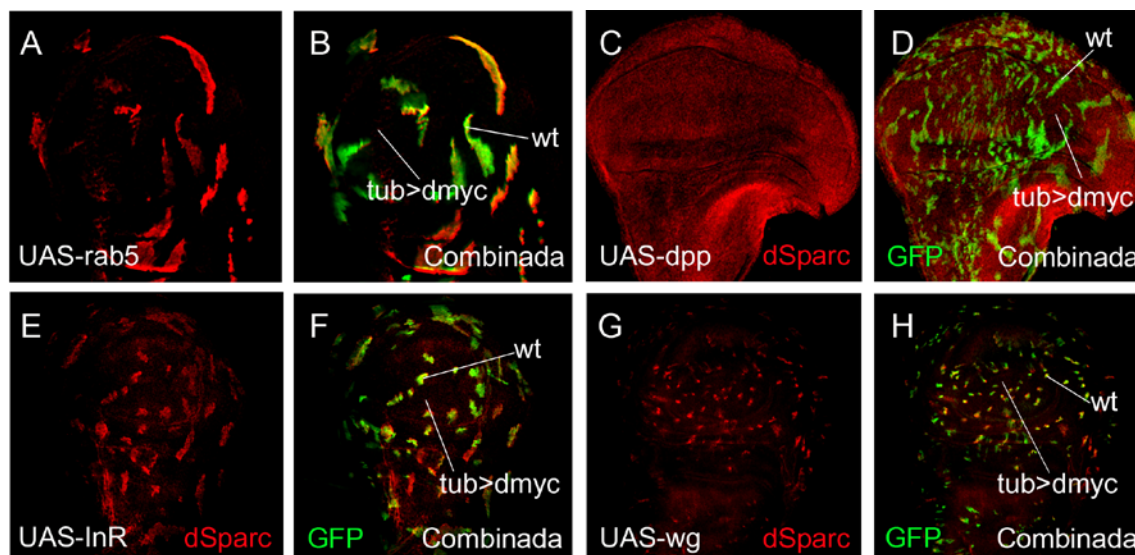


Figura 25. Epistasis III: (A-B) En el experimento de supercompetición, la estimulación de la endocitosis sobreexpresando *rab5* en los clones perdedores (*wt*) (verdes), no previene el aumento de expresión de dSparc en competición celular (rojo). (C-D) La sobreexpresión de *dpp* en los clones perdedores (verde) reprime el incremento de expresión de dSparc principalmente en la bolsa alar (rojo). (E-F) Ni la sobreexpresión de *InR* específicamente en los clones perdedores (verde), ni la de *wg*, pueden reducir el incremento de expresión de dSparc (rojo).

Con todos estos datos podemos concluir que la vía JNK no es la responsable de la activación de dSparc durante la competición celular y que esta activación depende de Dpp.

7. Análisis funcional de dSparc.

Para analizar funcionalmente el papel de dSparc utilizamos ARNs de interferencia (ARNi) que nos permiten reducir la expresión de *dsparc* producido por las células perdedoras pero que permiten ciertos niveles de *dsparc* que se requieren para la integridad de la membrana basal (Martinek y cols. 2008). Las tres líneas de ARNi utilizadas procedentes de dos colecciones diferentes, tienen una posible off-target por homología de secuencia (*CG11874*) que es un gen de función desconocida. Primero se comprobó que el ARNi funcionaba específicamente contra *dsparc*. Observamos que *CG11874* se expresa en los

discos imaginales mediante ARNm FISH (hibridación in situ fluorescente) pero su expresión no se veía afectada por el *ARNi dsparc* (Figura 26).

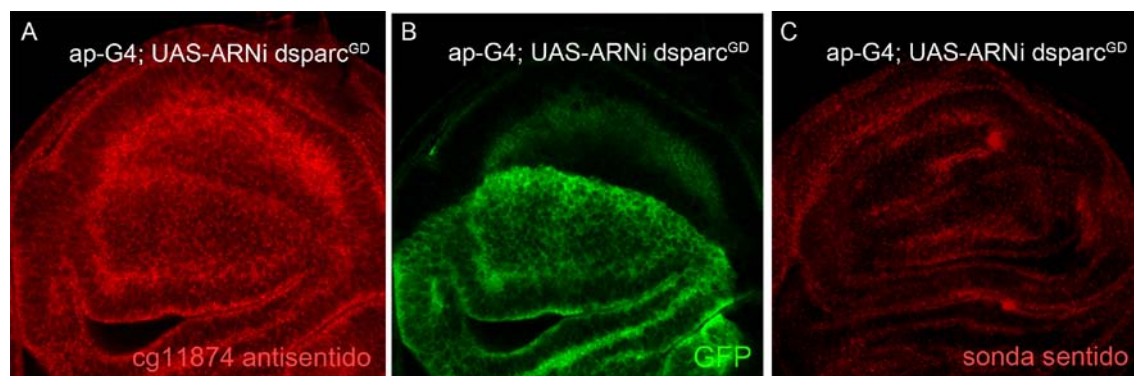


Figura 26. Especificidad del *ARNi-dsparc*: (A-C) Se expresó el *ARNi-dsparc* en el compartimento dorsal (B, verde) del disco imaginal de ala (*ap>Gal4*), y no se observa reducción en la expresión del ARNm de *cg11874* (A, rojo). Sonda control (C, rojo).

Previamente se sobreexpresó el *ARNi dsparc* específicamente en el compartimento dorsal del disco imaginal de ala (marcado con GFP), se realizó una inmunofluorescencia de dSparc y se observó una reducción de la expresión de dSparc en dicho compartimento (Figura 20). Además observamos que al sobreexpresar ubicuamente las líneas de *ARNi* utilizando el promotor *da-Gal4* se produce letalidad embrionaria, lo que concuerda con los datos previos ((Martinek y cols. 2008) consultar materiales y métodos).

Para estudiar si variaciones en los niveles de dSparc afectaban a la eliminación de los clones perdedores, se usó el ensayo de supercompetición. Se expresó el *ARNi dsparc* específicamente en los clones perdedores. Los clones de células perdedoras con la expresión normal de *dsparc* son eliminados o reducidos en tamaño 72h después de la inducción de clones (Figura 27A-B, G). Cuando el *UAS-ARNi dsparc* es activado específicamente en células perdedoras, la mayoría de esos clones son eliminados o reducidos en tamaño 48h después de la inducción de clones (Figura 27C-D, G) mientras que los clones perdedores con niveles intactos de dSparc muestran este efecto 72h después (Figura 27A-B, G).

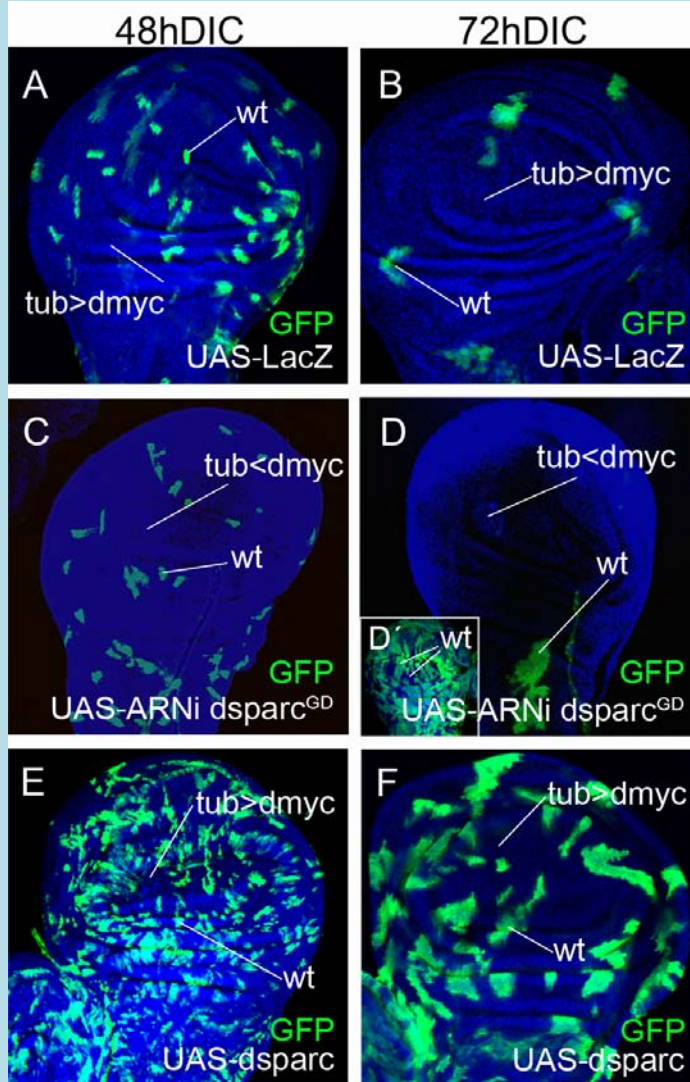


Figura 27. Análisis funcional I: (A-B) Células silvestres (*wt*) marcadas con GFP en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* como control (A) 48h después de la inducción de clones y 72h (B) las células silvestres se eliminan gradualmente primero en la bolsa alar hasta que solo unos pocos clones permanecen en la periferia. (C-D) Clones de células que expresan el *ARNi-dsparc* marcados con GFP generados en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* 48h (C) después de la inducción de clones y 72h (D) el *ARNi-dsparc* produce una eliminación más rápida de los clones perdedores. (D') Clones control silvestres que expresan el *ARNi-dsparc* (verde). (E-F) Clones de células que sobreexpresan *dsparc* marcados con GFP generados en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* 48h (E) después de la inducción de clones y 72h después de la inducción de clones (F) La sobreexpresión de *dsparc* rescata la eliminación de los clones perdedores. (G) Cuantificación de los clones perdedores en el ensayo de supercompetición en diferentes tiempos después de la inducción

de clones. El número de animales analizados está indicado (n). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco indica significancia estadística en una T-Student $p < 0,0001$.

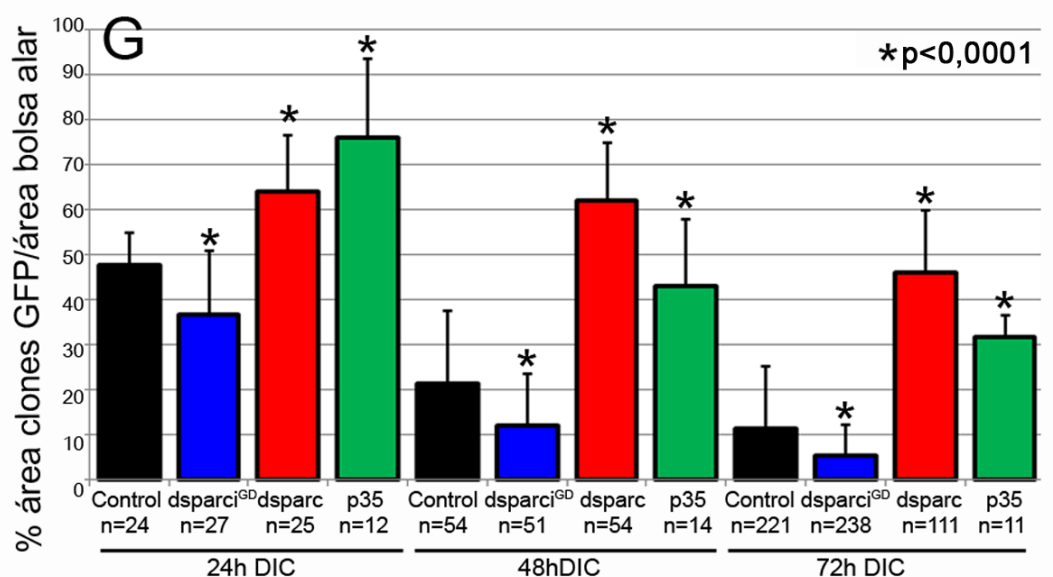


Figura 28. Análisis funcional II: (A,E) Células silvestres (*wt*) marcadas con GFP (verdes) en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* como control (A) 48h después de la inducción de clones y 72h (E). Las células silvestres se eliminan gradualmente primero en la bolsa alar hasta que solo unos pocos clones permanecen en la periferia. (B, F) Células silvestres (*wt*) marcadas con GFP en un fondo de sobreexpresión de *dmyc*, en discos mutantes heterocigotos para una delección de *dsparc* (B) 48h, y 72h después de la inducción de clones (F). Las células silvestres se eliminan más rápido de la bolsa alar de discos mutantes *dsparc* heterocigotos, comparar con el control. (C, G) Clones de células que expresan el *ARNi-dsparc* (Colección GD, ID16678) marcados con GFP generados en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* 48h (C) después de la inducción de clones y 72h (G) el *ARNi-dsparc* produce una eliminación más rápida de los clones perdedores comparado con el control. (D-H) Clones de células que expresan el *ARNi-dsparc* (Colección KK, ID100566) marcados con GFP generados en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* 48h después de la inducción de clones (D) y 72h (H). (I) Cuantificación de los clones perdedores en el ensayo de supercompetición 48 y 72h después de la inducción de clones. El número de animales analizados está indicado (n). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco indica significancia estadística en una T-Student $p < 0,0001$.

Para investigar si dSparc funciona como una señal protectora que retrasa parcialmente la eliminación de las células perdedoras, se generaron líneas de moscas transgénicas *UAS-dSparc* y *UAS-dSparc-HA* (con una cola de HA en C-terminal), que permitían sobreexpresar *dsparc* en las células perdedoras. Se obtuvieron varias líneas transgénicas de sobreexpresión de *dsparc*. Se comprobó su funcionalidad y sus niveles de expresión de dos maneras: En primer lugar se sobreexpresaron las líneas *UAS-dsparc* específicamente en el compartimento dorsal del disco imaginal de ala (marcado con GFP), se realizó una inmunofluorescencia de dSparc y se observó la expresión de dSparc (Figura 29A-C). Es importante tener en cuenta que con el anticuerpo específico contra dSparc se puede detectar tanto la sobreexpresión, como la expresión endógena de dSparc, mientras que con el anticuerpo contra HA solo se detecta la sobreexpresión. Lo mismo ocurre en células S2 transfectadas con *dsparc-HA* (Figura 29D-E). En segundo lugar se realizó un western-blot a partir de proteínas que se extrajeron de un cruce *da-Gal4* con cada una de las líneas de sobreexpresión de *dsparc*, y se seleccionó una línea de cada cromosoma con niveles de expresión elevados de *dsparc* (Figura 29F).

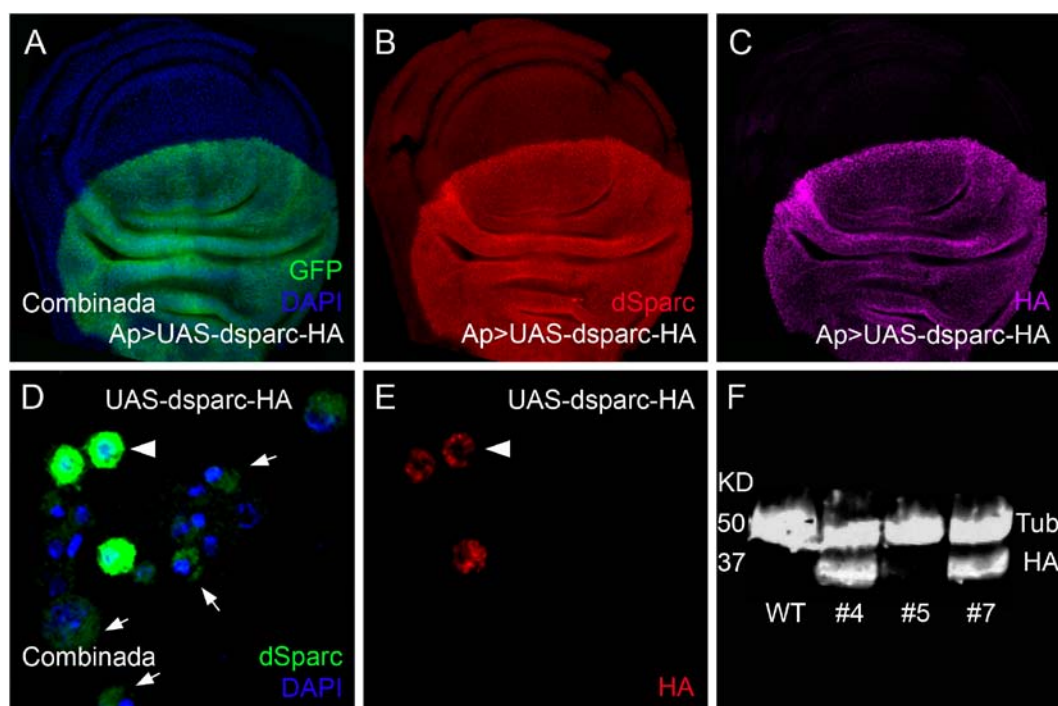


Figura 29. Funcionalidad de las líneas transgénicas de sobreexpresión de *dSparc*. (A-C) Sobreexpresión de *dSparc* (rojo) en el compartimento dorsal (verde). (A) El compartimento dorsal está marcado con GFP (verde), los núcleos están marcados con DAPI (azul). (B) El compartimento dorsal muestra la sobreexpresión de *dSparc* (rojo). En el compartimento ventral se observa la expresión endógena de *dSparc*. (C) Inmunofluorescencia con anti-HA (magenta) muestra la expresión de *UAS-dSparc-HA*. (D-E) Inmunofluorescencia doble de células transfectadas con *UAS-dSparc-HA* utilizando un anticuerpo monoclonal contra dSparc (verde) que reconoce la expresión endógena y la sobreexpresión de *dSparc-HA*, y un anti-HA para detectar la expresión de *dSparc* unido a HA (rojo). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). (F) Western-blot que muestra los niveles de expresión de varias líneas transgénicas de sobreexpresión de *dSparc*.

Al expresar *dSparc* en las células perdedoras, se observó que la competición celular se inhibe y las células perdedoras sobreviven mejor (Figura 27E-G). La sobreexpresión de *dSparc* es capaz de bloquear su eliminación incluso mejor que bloqueando la apoptosis mediante la sobreexpresión de *p35* (Figura 27G). Basándonos en estos resultados concluimos que dSparc es capaz de actuar como una señal protectora de las células perdedoras.

Como ya se ha visto anteriormente, Dpp y dMyc son dos factores cuyos niveles de expresión son importantes en el proceso de competición celular. Para averiguar si dSparc afecta a la señalización de Dpp o a la expresión de dMyc, variamos los niveles de expresión de *dSparc* específicamente en el compartimento dorsal del disco imaginal de ala y realizamos una immuno-

fluorescencia contra pMad o dMyc. Observamos que la variación de la expresión de *dsparc* en el compartimento dorsal del disco imaginal de ala no afecta a la expresión de pMad (Figura 30A-B) ni tampoco a la expresión de dMyc (Figura 30C-D). La señalización de Dpp tampoco se ve afectada cuando variamos los niveles de expresión de *dsparc* específicamente en clones en un fondo de células silvestres (Figura 30E-H).

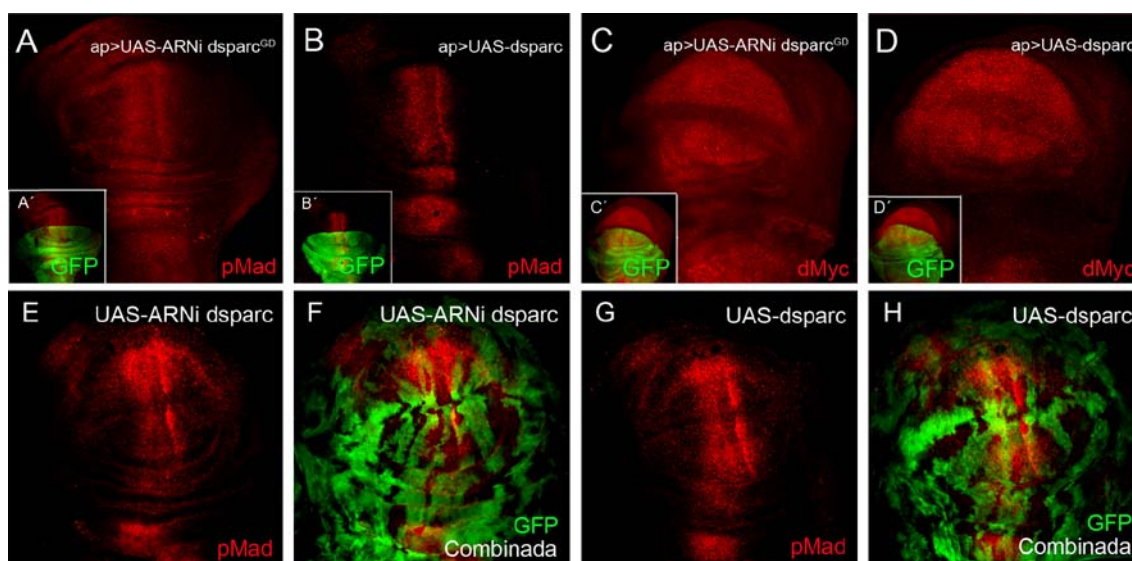


Figura 30. Los niveles de expresión de *dsparc* no afectan a la señalización de Dpp ni a la expresión de dMyc. (A-B) Activación de *UAS-ARNi dsparc* o sobreexpresión mediante el transgen *UAS-dsparc* en el compartimento dorsal del disco imaginal de ala (verde) no afecta a los niveles de pMad (rojo). (C-D) Activación de *UAS-ARNi dsparc* o sobreexpresión mediante el transgen *UAS-dsparc* en el compartimento dorsal del disco imaginal de ala (verde) no afecta a la expresión de dMyc (rojo). (E-F) La expresión de *UAS-ARNi dsparc* en clones (verde) en un fondo silvestre no afecta a la expresión de pMad (rojo). (G-H) La sobreexpresión de *dsparc* en clones (verde) en un fondo silvestre no afecta a la expresión de pMad (rojo).

Puesto que previamente habíamos observado que la sobreexpresión de *dsparc* es capaz de bloquear la eliminación de las células perdedoras por competición celular, se realizó una inmunofluorescencia para ver la expresión de caspasa 3 activa. Observamos que las células que sobreexpresan *dsparc* y sobreviven en un fondo de sobreexpresión de *dmyc*, no muestran activación de caspasa (Figura 31C-D comparar con Figura 31A-B donde la sobreexpresión de *p35* bloquea apoptosis pero no previene la activación de caspasa), lo que nos indica que niveles elevados de *dsparc* son suficientes para interrumpir el

proceso de eliminación por competición celular antes de la activación de caspasa. Estos experimentos sugieren que dSparc actúa por debajo de la retirada de factores de supervivencia pero antes de la activación de caspasa.

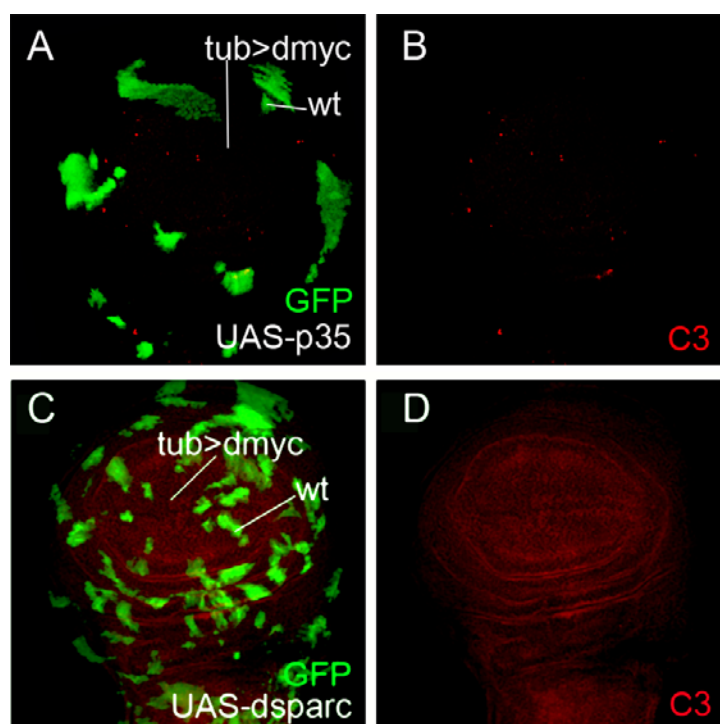


Figura 31. La sobreexpresión de dsparc bloquea la apoptosis inducida por competición celular. (A-B) Clones perdedores que expresan *p35* (verde) en un fondo *tub>dmyc* 72h después de la inducción de clones. Expresión de Caspasa 3 en rojo. (C-D) Clones perdedores que sobreexpresan *dsparc* (verde) en un fondo *tub>dmyc* 72h después de la inducción de clones. Expresión de caspasa 3 en rojo. En este caso no hay activación de caspasa 3 (no hay células apoptóticas en rojo).

8. dSparc no es un inhibidor general de apoptosis.

Una posibilidad es que dSparc sea un inhibidor general de apoptosis. Para descartarlo inducimos apoptosis de varias maneras diferentes independientes de competición celular.

Primero se irradiaron discos imaginales de ala en los que se sobreexpresó *dsparc* en el compartimento posterior mediante el promotor “*engrailed*”. Se realizó una inmunofluorescencia contra Caspasa 3 activa pero no se observaron diferencias en el número de células apoptóticas de cada compartimento (Figura 32).

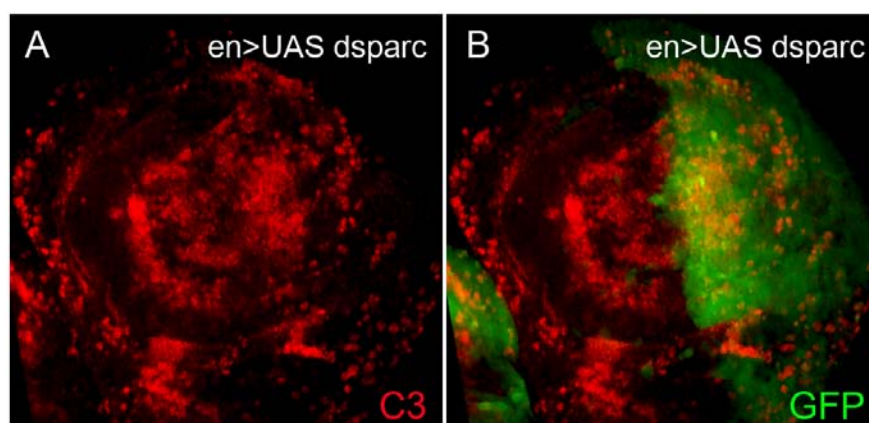


Figura 32. dSparc no bloquea muerte inducida por irradiación. (A) Inmunofluorescencia de Caspasa 3 (rojo), en discos en los que se ha sobreexpresado *dsparc* en el compartimento posterior (verde), 24h después de irradiar (1500 rads).

Se ha publicado previamente que la expresión de *egr* bajo el control de *gmr* (promotor específico de ojo) produce apoptosis en células posteriores al surco morfogénico y resulta en la eliminación del órgano (Igaki y cols. 2002; Moreno y cols. 2002b). Co-expresamos *egr* y *lacZ* como control y observamos la eliminación casi total del ojo (Figura 33A). Comparamos el tamaño del ojo de estas *Drosophilas* con individuos en los que se co-expresaron *egr* y el inhibidor de apoptosis *dIAP1* y se observó una supresión parcial del fenotipo de eliminación de ojo (Figura 33C). También se co-expresó *egr* y un *ARNi egr* como control y se observó una supresión total del fenotipo de eliminación de ojo que resulta en un ojo silvestre (Figura 33D). Co-expresamos *egr* y *dsparc* y observamos que la sobreexpresión de *dsparc* no es capaz de suprimir la eliminación del fenotipo inducido por *egr* (Figura 33B). En la gráfica que acompaña a esta figura se pueden consultar las cuantificaciones y el análisis estadístico de estos datos (Figura 33E).

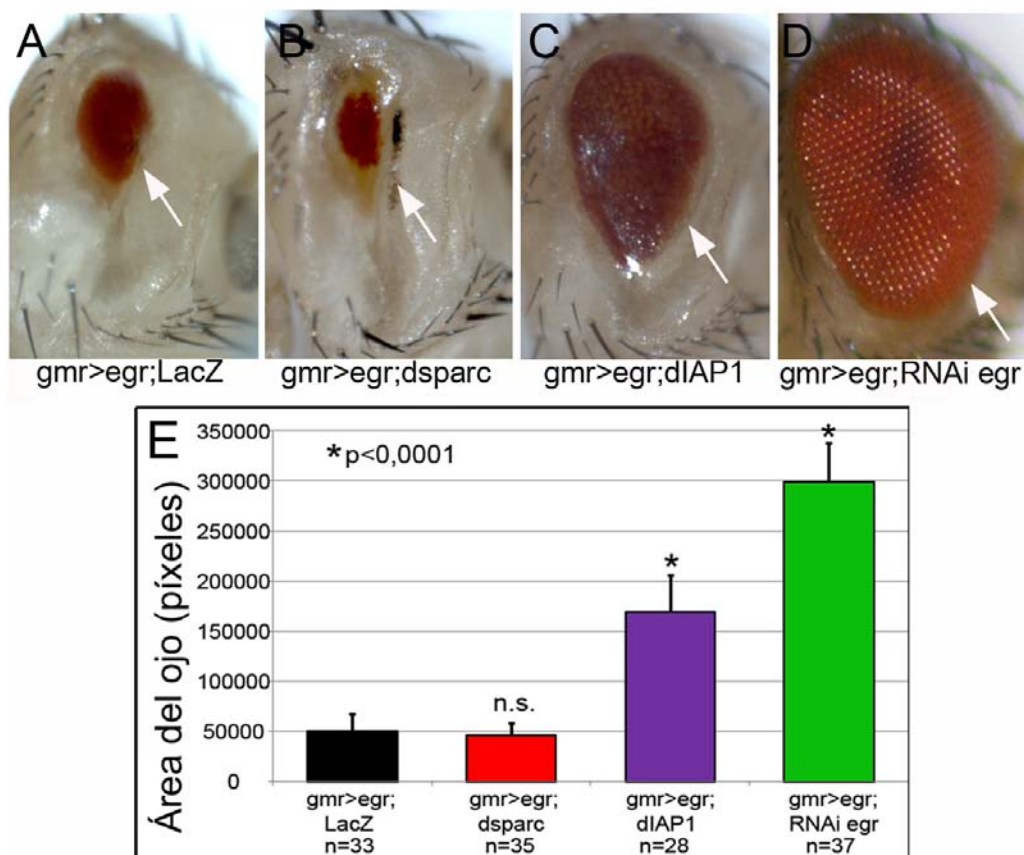


Figura 33: dSparc no es un inhibidor general de apoptosis I. (A) Cuando *egr* es sobreexpresado específicamente en el ojo utilizando el promotor *gmr*, causa eliminación del órgano. (B) La coexpresión de *egr* y *dsparc* no bloquea la eliminación del ojo. (C) La coexpresión de *egr* y *dIAP1* suprime parcialmente el fenotipo de eliminación de ojo. (D) La coexpresión de *egr* y *ARNi-egr* rescata la eliminación del ojo y da lugar a un ojo silvestre. (E) Cuantificación del área del ojo de los diferentes genotipos. El número de animales analizados está indicado (n). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco indica significancia estadística en una T-Student $p<0,0001$, n.s. significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.

La mayoría de los ensayos que se han utilizado para investigar la habilidad de dSparc para inhibir apoptosis se han llevado a cabo en escenarios de muerte celular muy agresiva y sobreexpresando factores proapoptóticos. Examinamos el efecto de la sobreexpresión de *dsparc* en situaciones de muerte celular más fisiológica: por ejemplo la apoptosis involucrada en la rotación de la terminalia de los machos de *Drosophila*. La terminalia de *Drosophila* deriva del disco genital que está constituido por la fusión de tres segmentos abdominales embrionarios: A8, A9 y A10. En el disco genital del macho el primordio A8 da lugar al tergito T8, mientras que el A9 forma la

genitalia masculina y el A10 forma la analia y el intestino posterior (Gleichauf, 1936; Adam y cols. 2003). La formación de estas estructuras ocurre durante la pupación. Hay una fusión en la línea media dorsal del disco genital y una rotación de 360° en el sentido de las agujas del reloj que están relacionadas con la maduración de la genitalia interna (Gleichauf, 1936; Adam y cols. 2003). Se ha demostrado previamente que mutaciones en el gen proapoptótico *hid* afectan a la rotación de la terminalia (Abbott y Lengyel 1991), así como bloqueando apoptosis mediante la sobreexpresión de *p35* o alterando la vía JNK (Macias y cols. 2004) se producen diferentes grados de rotación incompleta. Sobreexpresamos *dsparc* bajo el control del promotor *engrailed* y observamos que mientras que la sobreexpresión de *p35* da lugar a una rotación incompleta (Figura 34B, comparar con el control en el que se expresa *lacZ* Figura 34A), la sobreexpresión de *dsparc* produce una terminalia silvestre con una rotación completa de 360° (Figura 34C), similar a una situación en la que se sobreexpresa *lacZ* como control (Figura 34A). Por lo tanto dSparc no bloquea esta apoptosis que ocurre durante el desarrollo y sugiere que el efecto protector de dSparc es específico de competición celular.

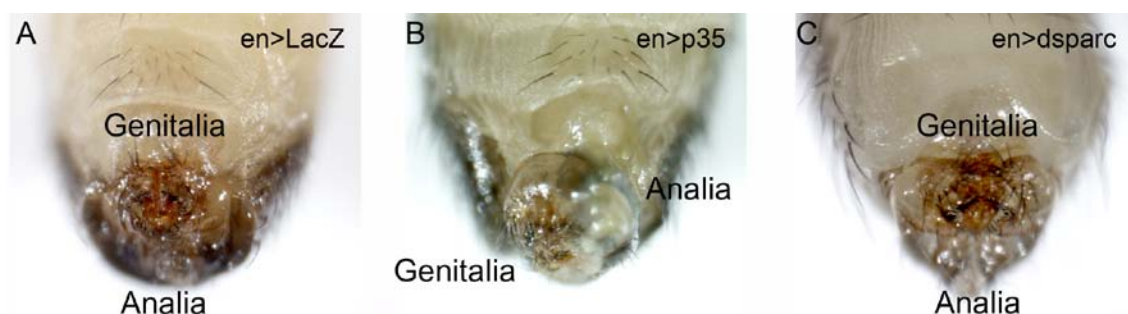


Figura 34. dSparc no es un inhibidor general de apoptosis II. (A) Macho silvestre con la parte ventral hacia arriba muestra la posición correcta de la terminalia externa (Analia y genitalia están indicadas). (B) Si se inhibe la apoptosis en la terminalia durante el desarrollo (*en-Gal4>UAS-p35*), los machos muestran una rotación incompleta comparado con los individuos silvestres. (C) Los machos que sobreexpresan *dsparc* en la terminalia (*en-Gal4>UAS-p35*) muestran una terminalia con rotación completa (silvestre).

Los discos imaginales de ala con el siguiente genotipo: *ap-gal4/+* muestran apoptosis aleatoria en la bolsa alar que es más elevada en la región

dorsal del ala en desarrollo (Figura 35A, D), pero esto no parece afectar a la morfología del ala adulta (Calleja y cols. 1996). Se sobreexpresó *dIAP1* en el compartimento dorsal del disco imaginal de ala marcado con GFP y se observó una reducción de la apoptosis en este compartimento (Figura 35B, E), mientras que la sobreexpresión de *dsparc* no era capaz de inhibir la apoptosis en la región dorsal de la bolsa alar (Figura 35C, F). En la Figura 35G se puede observar una cuantificación de estos datos.

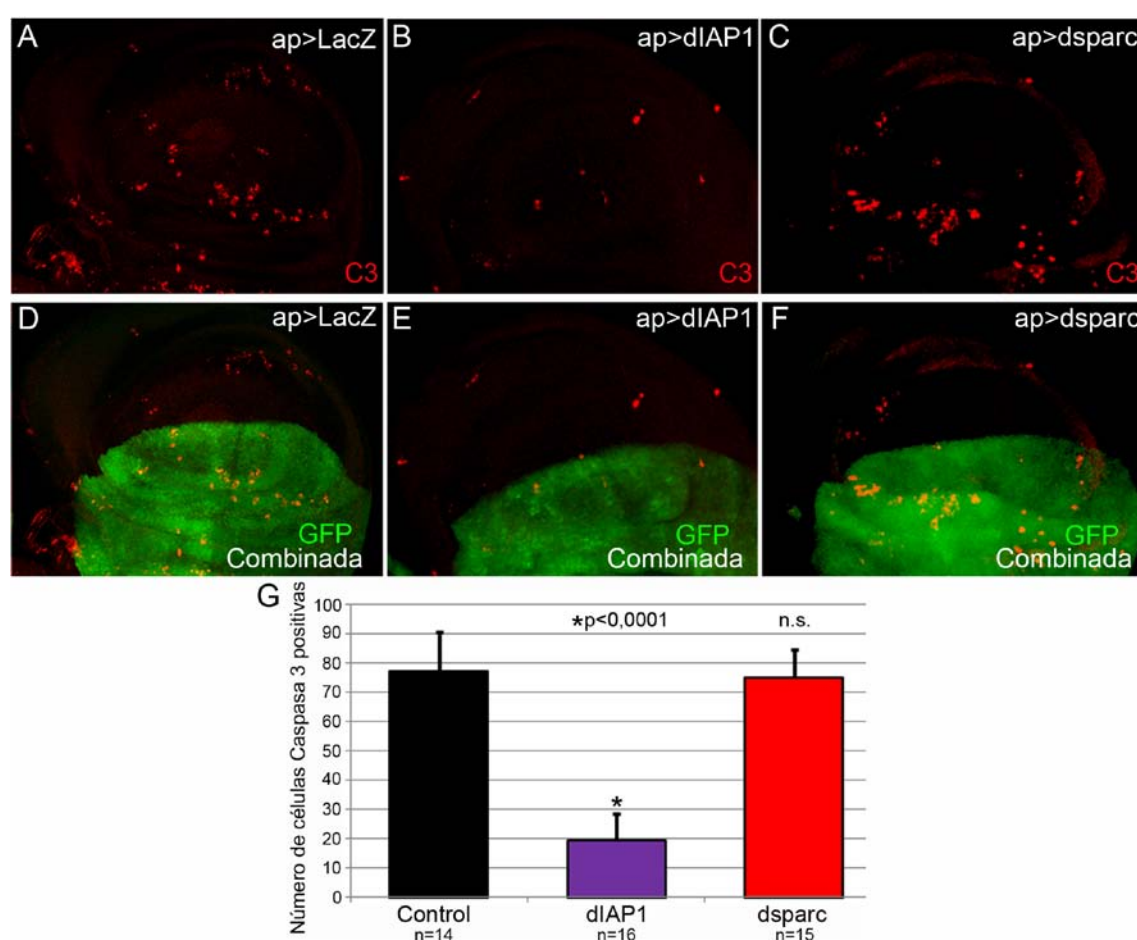


Figura 35. dSparc no es un inhibidor general de apoptosis III. (A-F) *lacZ* (A, D), *dIAP1* (B, E) y *dsparc* (C, F) se sobreexpresan en el compartimento dorsal del disco imaginal de ala (verde) mediante *ap>Gal4*. La Caspasa 3 activa se muestra en rojo. La apoptosis se inhibe con *dIAP1* pero no con *dsparc* donde la activación de Caspasa 3 es similar al control (A). (G) Cuantificación del número de células positivas para Caspasa 3 en los diferentes genotipos. El número de animales analizados está indicado (n). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco indica significancia estadística en una T-Student $p<0,0001$, n.s significa que no hay diferencias estadísticamente significativas.

La pata de *Drosophila* es un apéndice compuesto por nueve segmentos: coxa, trocánter, fémur, tibia, y cinco tarsos (T1-T5), separados por uniones flexibles. La pata se desarrolla a partir del disco imaginal de pata, un grupo de células que segrega al final de la embriogénesis, prolifera durante los estadios larvarios y evagina durante la pupación para formar el apéndice adulto. Durante el 3º estadio larvario se producen progresivas subdivisiones de la futura pata, esto se refleja en la sucesiva formación de pliegues en el disco que representan la localización de cada futura unión. Se ha demostrado previamente que la apoptosis es necesaria para la formación de las uniones de la pata y que este proceso es controlado por los genes pro-apoptóticos *hid*, *reaper* y *grim* (Manjon y cols. 2007). Cuando se inhibe la apoptosis en grandes dominios del disco de pata, los pliegues epiteliales distales y las uniones de la pata adulta están alteradas o ausentes. Para comprobar si la sobreexpresión de *dsparc* podía funcionar como inhibidor de apoptosis en esta situación se sobreexpresó en el compartimento posterior del disco imaginal de pata mediante el promotor *engrailed*. Como se puede observar en la Figura 36 *dsparc* no es capaz de inhibir la activación de caspasa (comparar con el compartimento anterior del disco). Además las patas adultas tienen las uniones de la pata correctamente formadas.

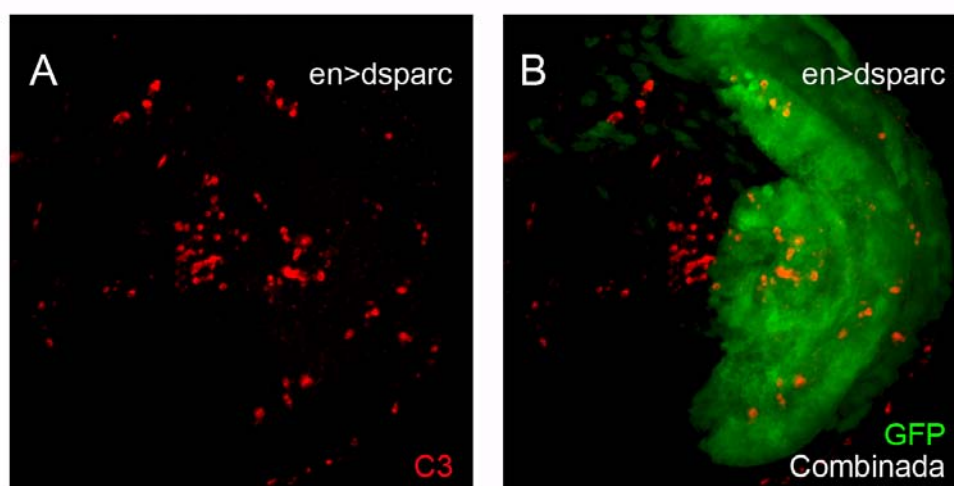


Figura 36. dSparc no es un inhibidor general de apoptosis IV. (A-B) *dsparc* se sobreexpresa en el compartimento posterior del disco imaginal de pata (verde) utilizando *en>Gal4*. La Caspasa 3 activa se muestra en rojo (A).

Otro ejemplo de escenario de muerte celular fisiológico es la apoptosis de la retina pupal. El ojo de *Drosophila* se compone de unas 750 unidades llamadas omatidios, organizados en un patrón hexagonal. Cada omatidio se compone de ocho neuronas fotoreceptoras, cuatro células cono y dos células pigmentarias primarias (Wolff y Ready 1991). Los omatidios están rodeados por células interomatidiales (células pigmentarias secundarias y terciarias y cerdas mecanosensoriales) que se encargan de separar los omatidios y mantener el patrón hexagonal del ojo adulto. 24h después del comienzo de la pupación, después de que todas las células de cada omatidio se han diferenciado y organizado, una ronda adicional de apoptosis reduce el número de células interomatidiales (Brachmann y Cagan 2003). Además hay otro evento de muerte celular programada más tarde durante la pupación. A las 36h después de la formación del pupario (DFP), se puede observar un anillo de células apoptóticas en la periferia del ojo (Wolff y Ready 1991). Estas células apoptóticas en el margen del campo de omatidios son fotoreceptores, células cono y células pigmentarias primarias (Wolff y Ready 1991; Hay y cols. 1994).

Se ha descrito que en retinas pupales 50h DFP, teñidas con naranja de acridina, se observan muchos fragmentos células muertas o muriendo, principalmente en el margen del ojo (Hay y cols. 1994).

En retinas en las que se sobreexpresó *lacZ* como control, se ve un anillo de células apoptóticas en la periferia (Figura 37A). Al inhibir la apoptosis sobreexpresando *p35* bajo el control de un promotor específico de ojo (*gmr*), no se observan fragmentos de naranja de acridina en la periferia y tan solo se observa una tinción difusa en células de la lámina óptica y cuerpos grasos (Hay y cols. 1994) (Figura 37B). Al sobreexpresar *dsparc* utilizando el promotor *gmr*, se observó una inhibición de la apoptosis similar a la que se puede ver al sobreexpresar *p35* (Figura 37C).

Teniendo en cuenta los anteriores resultados en ojos, patas y discos imaginales de ala, que sugieren que dSparc no es un inhibidor general de apoptosis, una posibilidad sería que, en el caso de la retina pupal, dSparc sea capaz de bloquear la apoptosis porque las células del margen de la retina son eliminadas por competición celular.

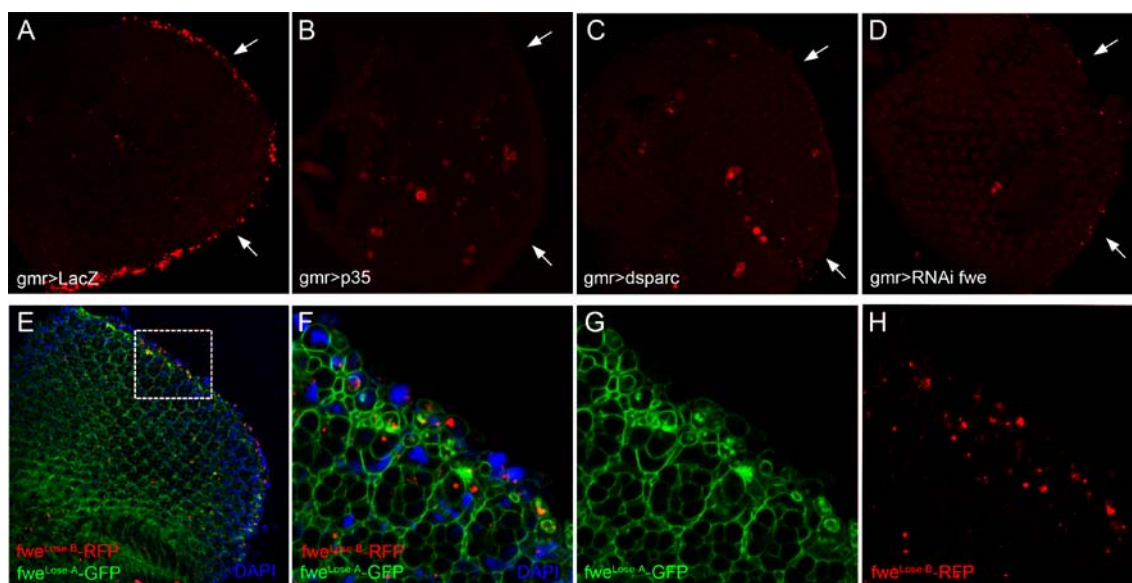


Figura 37. Competición celular en la retina pupal. (A) Retina pupal de 48h en la que se sobreexpresa *lacZ* específicamente en el ojo mediante *gmr>Gal4* (control). Acumulación de Naranja de Acridina en las células de la periferia (rojo) lo que indica muerte celular. (B) La expresión de p35 bloquea la apoptosis. No se observan fragmentos de naranja de acridina en la periferia. Se observa una tinción difusa en células de la lámina óptica y cuerpos grasos (rojo). (C) La sobreexpresión de *dsparc* mediante *gmr>Gal4* bloquea la apoptosis. No se observan fragmentos de naranja de acridina en la periferia. Se observa una tinción difusa en células de la lámina óptica y cuerpos grasos (rojo). (D) La expresión del ARNi-*fwe* mediante *gmr>Gal4* bloquea la apoptosis. Apenas se observan fragmentos de naranja de acridina en la periferia (rojo). (E-H) Retinas de moscas con el reportero fluorescente de *Fwe* (E). (F) magnificación de la imagen anterior, núcleos marcados con DAPI (azul). (G) En verde se observa la expresión de *Fwe*^{Lose-A} (GFP). (H) En rojo se observa la expresión de *Fwe*^{Lose-B} (RFP).

Se ha identificado recientemente la proteína de membrana Flower (Fwe) como componente de la maquinaria de respuesta de competición celular que es requerido para marcar las células como ganadoras o perdedoras (Rhiner y cols. 2010). En *Drosophila* el gen *fwe* da lugar a tres isoformas: *Fwe*^{ubi}, *Fwe*^{Lose-A} y *Fwe*^{Lose-B}. Niveles basales de *Fwe*^{ubi} son producidos constantemente. Durante la competición celular las formas *Fwe*^{Lose} se expresan en las células perdedoras. Las comparaciones entre células de los niveles relativos de *Fwe*^{ubi} y *Fwe*^{Lose} determinan finalmente cual de las células será eliminada por apoptosis inducida por competición celular.

Para ver si hay competición celular en la retina, utilizamos dos ensayos: un reportero fluorescente de *fwe* (Yao y cols. 2009) con el que se puede visualizar la expresión endógena de las formas *Fwe*^{Lose-A} y *Fwe*^{Lose-B} (Rhiner y

cols. 2010) y también disponemos de un *ARNi* específico contra *fwe* que inhibe la competición celular (Rhiner y cols. 2010). En el primer ensayo se expresó el *ARNi fwe* específicamente en el ojo con el promotor *gmr* y en este caso se observó una inhibición de la apoptosis similar a la observada mediante la sobreexpresión de *p35* y *dsparc* (Figura 37D).

En el segundo ensayo se extrajeron las retinas de *Drosophila*s con el reportero fluorescente de *fwe*, 48h DFP y observamos expresión de las isoformas *fwe*^{Lose} (Figura 37E-H), *fwe*^{Lose-B} marcado con RFP en el margen de la retina (Figura 37H). En el caso de *fwe*^{Lose-A} (marcado con GFP) lo que se observa es una acumulación en el margen de la retina, ya que esta isoforma se expresa normalmente en el sistema nervioso (Yao y cols. 2009) (Figura 37G).

Al inhibir la expresión de todas las isoformas de *fwe* se inhibe la competición celular y la apoptosis en el margen de la retina. Además las células del margen de la retina expresan las formas *Fwe*^{Lose-A} y *Fwe*^{Lose-B} características de células perdedoras en competición celular. Estos resultados sugieren que la apoptosis que ocurre en el margen de la retina durante la pupación intermedia-tardía podría deberse a una eliminación de células por competición celular.

Todos estos datos sugieren que dSparc no es un inhibidor general de apoptosis a pesar de su potente capacidad de inhibir apoptosis inducida por competición celular.

9. dSparc protege células S2 de una “señal de muerte”.

Después decidimos averiguar cómo funciona la sobreexpresión de dSparc para amortiguar las deficiencias de factores de supervivencia en las células perdedoras. Para ello utilizamos células Schneider 2 (S2). Primero comprobamos si dSparc-HA se secreta en células S2 de *Drosophila*. Para ello se transfectaron células S2 con un plásmido *pUASp-dSparc-HA* y un plásmido *acta1>Gal4* para activar las construcciones *UAS*, y se realizó un western-blot de la fracción celular y el sobrenadante por separado. Como se puede observar en el western-blot (Figura 38) dSparc se encuentra en la fracción celular y

también en el sobrenadante, lo que indica que se secreta al igual que el ortólogo humano y confirma la funcionalidad de la señal de secreción. Además se observa una banda de mayor peso molecular (75kD) que sugiere que dSparc podría formar homodímeros o heterodímeros con otra proteína de un peso molecular similar a dSparc.

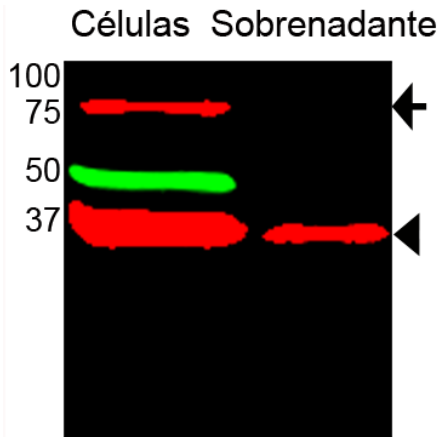


Figura 38. dSparc se secreta. Western-blot con proteínas de células S2 transfectadas con dSparc-HA y sus respectivos sobrenadantes. dSparc-HA se detecta con un anti-HA (banda roja, punta de flecha) en el sobrenadante y en la fracción celular. La tubulina (verde) se usa como control de carga y se encuentra en la fracción celular como se espera. Se encuentran complejos proteicos que incluyen dSparc (banda roja, flecha).

De manera similar a lo que se observa en las células perdedoras en los discos imaginales de ala, las células S2 sobreexpresan dSparc en una situación de retirada de suero como se puede observar en la inmunofluorescencia contra dSparc (Figura 39A-B).

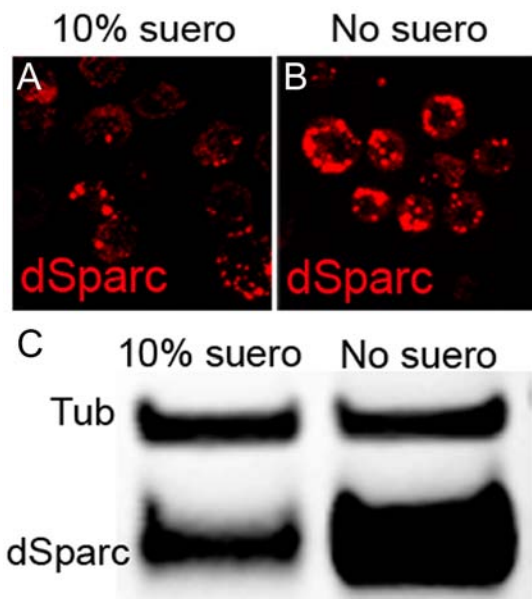


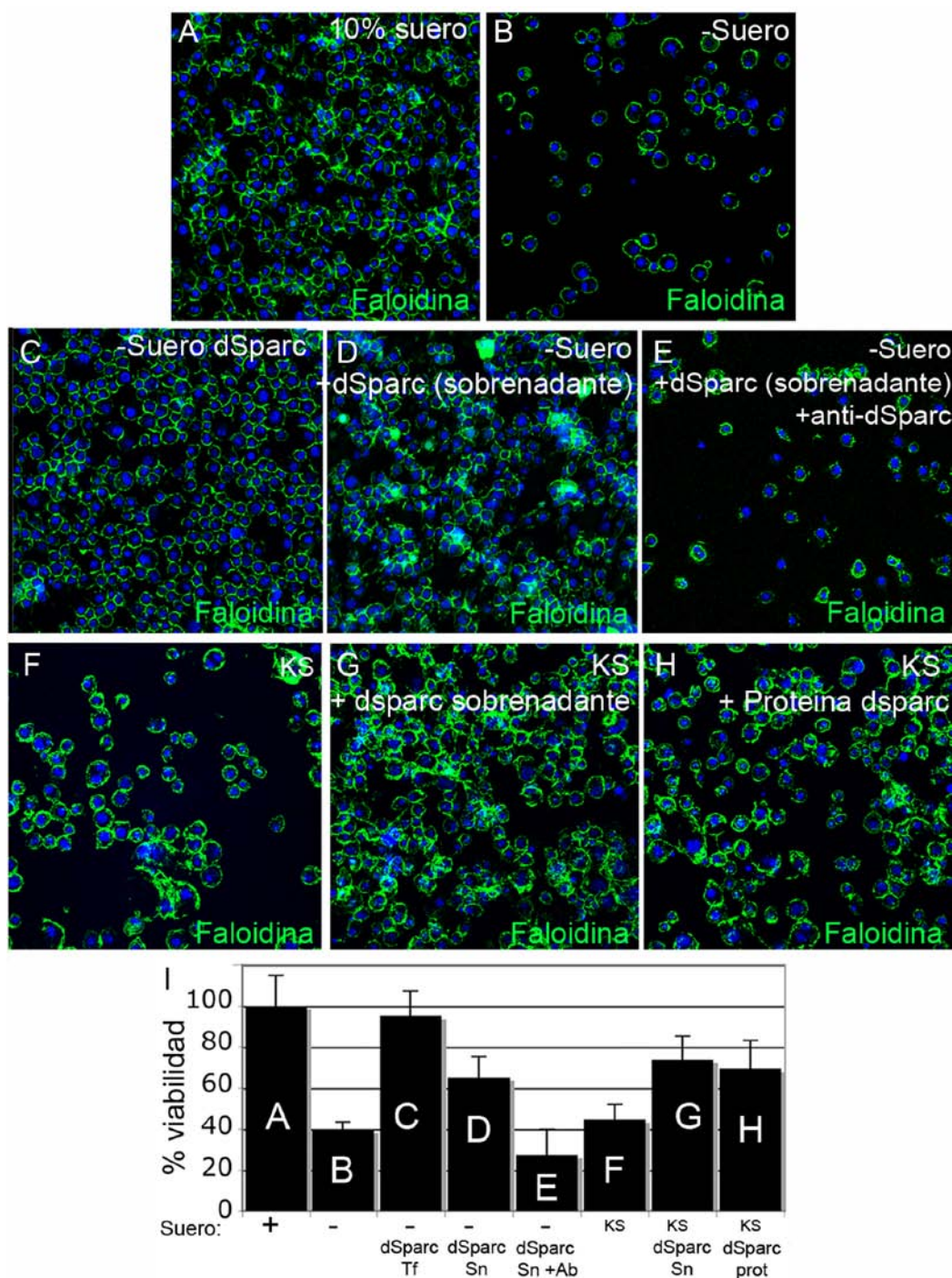
Figura 39. La expresión de dSparc aumenta en condiciones de medio sin suero. Expresión endógena de dSparc en células S2 crecidas en medio con 10% de suero (A) o en medio sin suero (B). (C) Western-blot con proteínas de células S2 crecidas en medio con 10% de suero o en medio sin suero. dSparc se detectó con un anti-dSparc y la tubulina se utilizó como control de carga.

También se realizó un western-blot con lisados de células S2, antes y después de la retirada del suero del medio, confirmando que los niveles de dSparc aumentan después de la retirada de suero (Figura 39C). Estos resultados sugieren que dSparc es secretado al medio donde podría ejercer un efecto protector.

Para evaluar el posible papel protector de dSparc después de la retirada de factores de supervivencia (medio sin suero), las células S2 fueron transfectadas con *dsparc* o *GFP* como control (Figura 40A), y después de 48h, se retiró el suero del medio de las células. La supervivencia celular y la apoptosis fueron medidas 24h después. Solo el 40% de las células transfectadas con *GFP* sobrevivieron después de la retirada del suero (Figura 40B), mientras que el 95% de las células S2 transfectadas con *dsparc* sobrevivieron después del mismo tratamiento (Figura 40C).

Puesto que dSparc es secretado en el medio por las células S2, decidimos averiguar si la presencia de la proteína dSparc en el sobrenadante podría conferir alguna protección a las células S2 silvestres después de la retirada del suero. Para averiguar esto, se usó medio sin suero procedente de células transfectadas con *dsparc* y se añadió a células silvestres en medio sin suero. La supervivencia celular y la apoptosis fueron medidas 48h después y como resultado se observó una protección significativa de estas células (Figura 40D). Al añadir anticuerpo dSparc a este medio la situación de protección se revirtió (Figura 40E). También se irradiaron células S2 transfectadas con *dsparc* o con *GFP* como control y se observó que la sobreexpresión de *dsparc* no inhibía este tipo de apoptosis inducida por irradiación, de la misma manera que ocurre en el disco imaginal de ala.

Figura 40. dSparc protege a las células S2 de una señal de muerte. (A) Células S2 en medio con 10% de suero, (B) en medio sin suero, (C) transfectadas con *dsparc-HA* en medio sin suero, (D) células S2 en medio sin suero con sobrenadante enriquecido en dSparc (procedente de 40C). (E) células S2 en medio sin suero con sobrenadante enriquecido en dSparc + anticuerpo específico de dSparc. (F) Células S2 después de 36h en medio enriquecido en KS (sobrenadante de 40B + 10% suero). (G) Células S2 en medio enriquecido en KS + sobrenadante enriquecido en dSparc (de 40C). (H) Células S2 en medio enriquecido en KS + 150ng/100µl de proteína purificada de dSparc. Las células S2 están teñidas con faloidina (verde) para visualizar el contorno celular y los núcleos están marcados con DAPI (azul). (I) Gráfico que representa el porcentaje de supervivencia de las células en los diferentes tratamientos: suero o señal de muerte (KS). Tf=transfectado. Sn=sobrenadante. Ab=anticuerpo dSparc. Las barras de error representan el error estándar, n=3.



Para intentar averiguar el mecanismo de acción de dSparc, se retiró el suero de células S2 durante 24-48h y cuando éstas comenzaron a morir, se recolectó el sobrenadante de esas células y se añadió 10% de suero (condiciones normales), lo llamamos “medio-Kiling Signal” (medio-KS). Este

medio se añadió a células sanas, y se observó que inducía muerte (Figura 40F), sugiriendo que hay presente al menos una señal de muerte secretada (KS). Para probar si dSparc secretado podía inactivar la KS, se combinó el medio-KS con el sobrenadante de células transfectadas con el plásmido *dsparc* y se observó que el efecto de la KS era revertido por la presencia de dSparc en el medio (Figura 40G). Además cuando el mismo medio-KS es añadido a células S2 sanas junto con proteína purificada de dSparc, la supervivencia celular se incrementaba (Figura 40H). Todos estos resultados fueron cuantificados y se encuentran representados en la gráfica de la Figura 40I. Los resultados anteriores indican que la KS es una molécula secretada. Una posibilidad es que dSparc secretado sea neutralize la KS desconocida directamente en el espacio extracelular. Otra posibilidad es que dSparc active una vía de señalización protectora que contrarreste los efectos de la KS.

10.dSparc y Fwe actúan en diferentes rutas en competición celular.

Puesto que dSparc y Fwe tienen funciones específicas en competición celular, decidimos comprobar si hay alguna relación entre los dos, o si forman parte de la misma ruta de señalización.

Se ha demostrado previamente que la reducción de las isoformas de Fwe en los clones perdedores disminuye la eliminación de estos clones por competición celular (Rhiner y cols. 2010). Una posibilidad sería que al disminuir la eliminación de los clones perdedores ya no fuera necesaria la sobreexpresión de dSparc.

Primero utilizamos el ensayo de supercompetición y se expresó el *ARNi* de *fwe* específicamente en las células silvestres perdedoras en un fondo de sobreexpresión de *dmyc*. Observamos que la reducción de la expresión de todas las isoformas de Fwe no interfería con la sobreexpresión de dSparc en las células perdedoras durante la competición celular (Figura 41A-B).

Otra posibilidad sería que al sobreexpresar *dsparc* en células perdedoras, se inhibiera la expresión de las isoformas Fwe^{Lose} , y así se bloqueara la eliminación los clones perdedores por competición celular. Para

comprobar esta hipótesis se sobreexpresó *dsparc* en clones de células perdedoras (GFP) en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* y se realizó una hibridación in-situ fluorescente con una sonda específica para *fwe*^{Lose-A}. Observamos que la expresión de *fwe*^{Lose-A} que se produce en situaciones de competición celular no se ve afectada por la sobreexpresión de *dsparc* durante la competición celular (Figura 41C-D).

La sobreexpresión de las isoformas Fwe^{Lose} inducen apoptosis (Rhiner y cols. 2010). Para comprobar si dSparc se encuentra sobreexpresado en estas situaciones, se generaron clones silvestres que sobreexpresan *fwe*^{Lose-A} o *fwe*^{Lose-B} en un fondo de células silvestres. Y se observó que la expresión endógena de dSparc no varía en todo el disco imaginal, ni en los clones que sobreexpresaban *fwe*^{Lose} (Figura 41E-H).

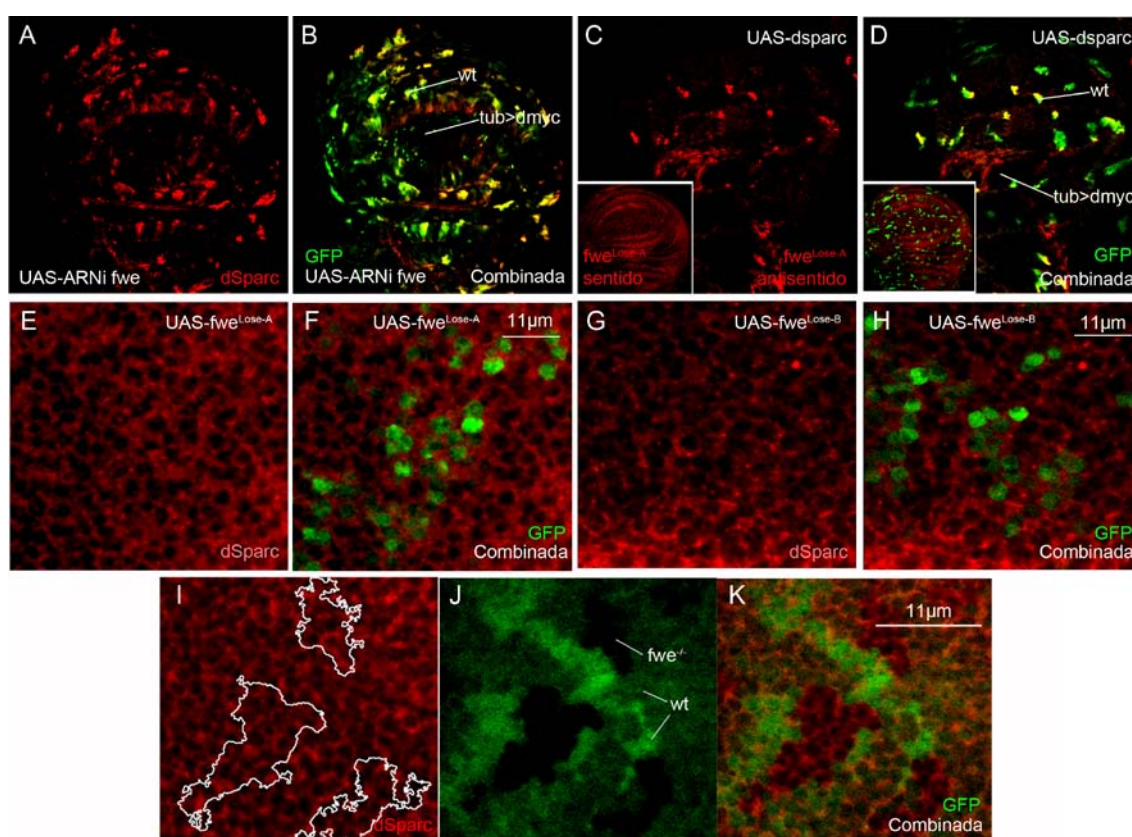


Figura 41. dSparc y Fwe actúan en vías diferentes en competición celular. (A-B) Expresión del *ARNi-fwe* específicamente en células silvestres (*wt*) marcadas con GFP (verde), rodeadas por células supercompetidoras (*tub>dmyc*). La inhibición de Fwe no interfiere con el incremento de expresión de dSparc en las células perdedoras durante la competición celular (rojo).

(C-D) Hibridación in-situ que revela la presencia del ARNm de *fwe*^{Lose-A} (rojo) en clones silvestres (verdes) que sobreexpresan *dSparc*. En los recuadros se puede ver la sonda sentido (control). (E-F) Clones silvestres que sobreexpresan *fwe*^{Lose-A} (verdes), rodeados por células silvestres, no muestran cambios en los niveles de dSparc (rojo). (G-H) Clones silvestres que sobreexpresan *fwe*^{Lose-B} (verdes), rodeados por células silvestres, no muestran cambios en la expresión de dSparc (rojo). (I-K) Clones mutantes *fwe*^{-/-} (ausencia de verde) en un fondo de células silvestres (verde) no muestran cambios en la expresión de dSparc (rojo).

Los clones de células mutantes homocigotas *fwe*^{-/-} son eliminados del tejido imaginal debido a la falta de *fwe*^{ubi}. La apoptosis de las células *fwe*^{-/-} se restringe a los bordes del clon, esto indica que es necesaria la presencia de células que expresen *fwe*^{ubi} (*fwe*^{+/-} o *fwe*^{+/+}) para que la apoptosis y eliminación de las células *fwe*^{-/-} pueda tener lugar (Rhiner y cols. 2010). Se generaron clones *fwe*^{-/-} y no se observaron cambios en la expresión de dSparc en los clones *fwe*^{-/-}, ni en los bordes de estos clones (Figura 41I-K).

Estos resultados sugieren que dSparc y Fwe funcionan en vías paralelas y tienen papeles opuestos durante la competición celular.

11. Restricción de dieta

Se ha descrito que cuando las larvas de *Drosophila* se mantienen en inanición la eliminación de los clones *Minute* por competición celular es menor (Simpson 1979). Esto sugiere una menor competición celular, lo que podría traducirse en menores niveles de expresión de dSparc en las células perdedoras.

Para ver si al inhibir la competición celular variaban los niveles de dSparc en los clones de células perdedoras, utilizamos el experimento de supercompetición en condiciones normales como control y en papilla restrictiva (con la mitad de nutrientes). Observamos que en las condiciones de restricción de dieta la expresión de dSparc en los clones perdedores se veía atenuada (Figura 42). Este resultado nos sugiere que dSparc tiene un papel específico en competición celular, ya que si su expresión en los clones de células perdedoras se ve atenuada por las condiciones de restricción de dieta, la sobreexpresión de dSparc ya no sería necesaria para la supervivencia de estos clones.

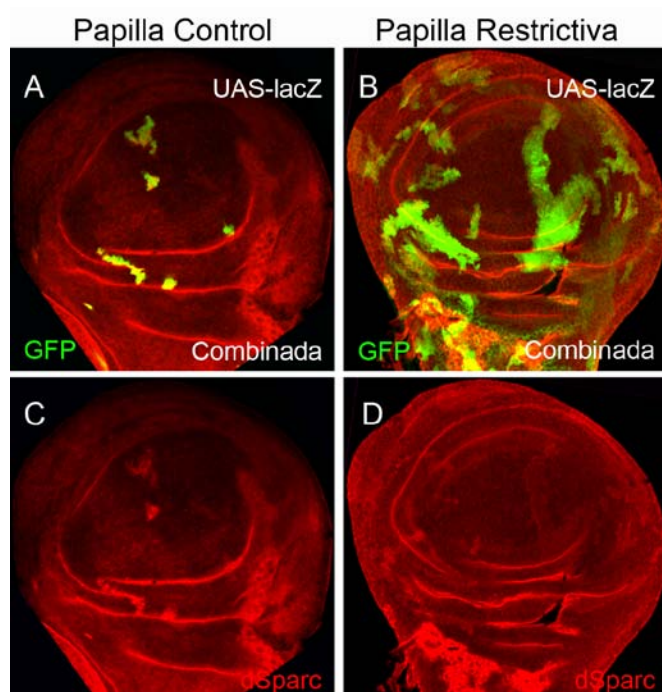
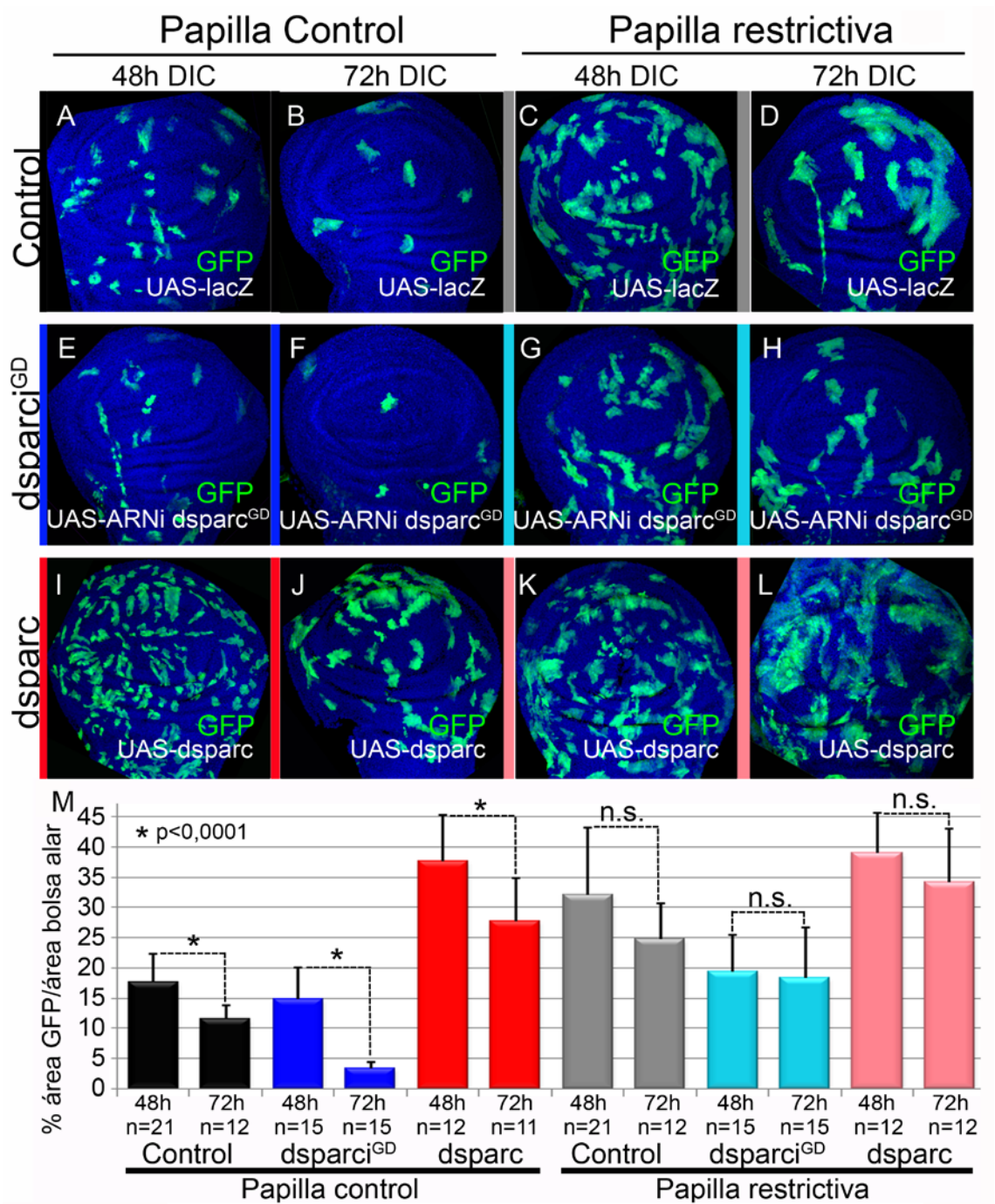


Figura 42. Expresión de dSparc en restricción de dieta. (A, C) Células silvestres (*wt*) marcadas con GFP (verde) en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* como control 72h después de la inducción de clones. Los clones silvestres (verde) en un fondo *tub>dmyc* aumentan la expresión de dSparc (rojo). (B, D) Células silvestres (*wt*) marcadas con GFP (verde) en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* control 72h después de la inducción de clones en condiciones de restricción de dieta, muestran un incremento de expresión de dSparc (rojo) en los clones perdedores más atenuado que en el control.

Para estudiar este fenómeno funcionalmente, utilizamos el experimento de supercompetición, pero en este caso reduciendo o aumentando la expresión de *dsparc* específicamente en los clones perdedores en condiciones de restricción de dieta. Analizamos el patrón de eliminación de los clones tomando como referencia 48 y 72h después de la inducción de clones. Observando el comportamiento de los controles crecidos en papilla normal, se comprobó que la competición celular se atenuaba en la situación de papilla restrictiva, ya que los clones de células perdedoras sobrevivían más tiempo y mejor en la bolsa alar comparado con el control (Figura 43A-D). Observamos que la eliminación de los clones con el tiempo no era estadísticamente significativa (Figura 43M). En el experimento en el que se redujo la expresión de *dsparc* específicamente en los clones de células perdedoras observamos también que la eliminación de los clones con el tiempo no es estadísticamente significativa, aunque partimos de una cantidad de clones similar al control lacZ de la papilla control (Figura 43E-H, M)). En el experimento en el que se aumenta la expresión de *dsparc* específicamente en los clones de células perdedoras observamos también que la eliminación de los clones con el tiempo no es estadísticamente significativa (Figura 43I-M).



N	Tipo de papilla		Papilla control					
	Genotipos	D.I.C	Control LacZ		dsparci ^{GD}		dsparc	
48h			72h	48h	72h	48h	72h	
Papilla restrictiva 1	Control LacZ	48h	0,0001					
		72h		0,0001				
	dsparci ^{GD}	48h			0,038			
		72h				0,0001		
	dsparc	48h					0,59	
		72h						0,05

Figura 43. Análisis funcional de dSparc en restricción de dieta. (A-B) Células silvestres (*wt*) marcadas con GFP en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* como control (A) 48h después de la inducción de clones y 72h (B) las células silvestres se eliminan gradualmente primero en la bolsa alar hasta que solo unos pocos clones permanecen en la periferia. (C-D) Células silvestres (*wt*) marcadas con GFP en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* como control (C) 48h después de la inducción de clones y 72h en papilla restrictiva (D). Las células silvestres en esta situación no experimentan una eliminación significativa con el tiempo. Hay clones que permanecen en la bolsa alar. (E-F) Clones de células que expresan el *ARNi-dsparc* marcados con GFP generados en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* 48h (E) después de la inducción de clones y 72h (F) el *ARNi-dsparc* produce una eliminación más rápida de los clones perdedores. (G-H) Clones de células que expresan el *ARNi-dsparc* marcados con GFP generados en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* 48h (G) después de la inducción de clones y 72h en papilla restrictiva (H). Hay menos clones de partida comparado con el control, pero el *ARNi-dsparc* en este caso no produce una eliminación más rápida de los clones perdedores. (I-J) Clones de células que sobreexpresan *dsparc* marcados con GFP generados en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* 48h (I) después de la inducción de clones y 72h después de la inducción de clones (J) La sobreexpresión de *dsparc* rescata la eliminación de los clones perdedores. (K-L) Clones de células que sobreexpresan *dsparc* marcados con GFP generados en un fondo de sobreexpresión de *dmyc* 48h (K) después de la inducción de clones y 72h después de la inducción de clones (L) en papilla restrictiva, se obtienen resultados similares a una situación de dieta no restrictiva. Pero en este caso no se produce una eliminación de clones significativa con el tiempo. (M) Cuantificación de los clones perdedores en el ensayo de supercompetición 48 y 72h después de la inducción de clones en condiciones normales y de restricción de dieta. El número de animales analizados está indicado (n). Las barras de error representan el error estándar. El asterisco indica significancia estadística en una T-Student $p < 0,0001$. n.s significa que no hay diferencias estadísticamente significativas. (N) Más datos relativos a significancia estadística.

Además, el porcentaje de clones perdedores que permanecen en la región de la bolsa alar es similar en las condiciones restrictivas respecto a las condiciones de papilla normal, lo que nos indica que el nivel de protección que confiere dSparc a los clones perdedores en una situación normal de supercompetición, es el máximo posible, ya que se obtienen los mismos resultados en escenarios en los que la competición celular se encuentra atenuada.

Sería posible que la eliminación de los clones perdedores se viera atenuada debido a que en condiciones de restricción de dieta las larvas de *Drosophila* crecieran más despacio, y por lo tanto los discos imaginales de ala también. Para comprobar esto, cuantificamos el tamaño de la bolsa alar de los discos en las dos situaciones de papilla normal y restrictiva, y obtuvimos como resultado una gráfica en la que se observa que el tamaño de la bolsa alar es similar en las tres condiciones (Figura 44).

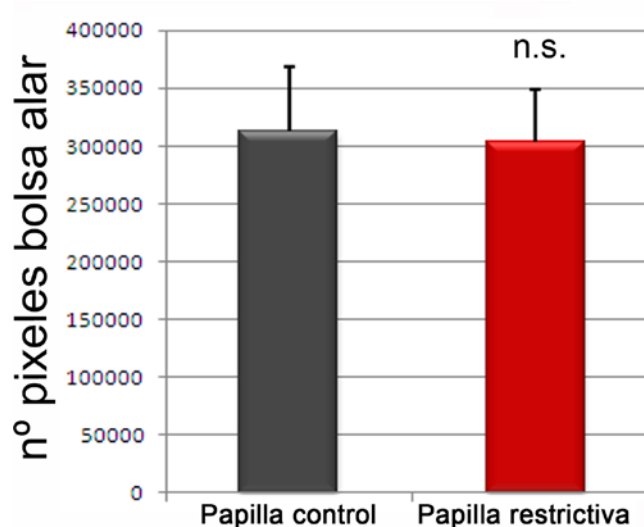
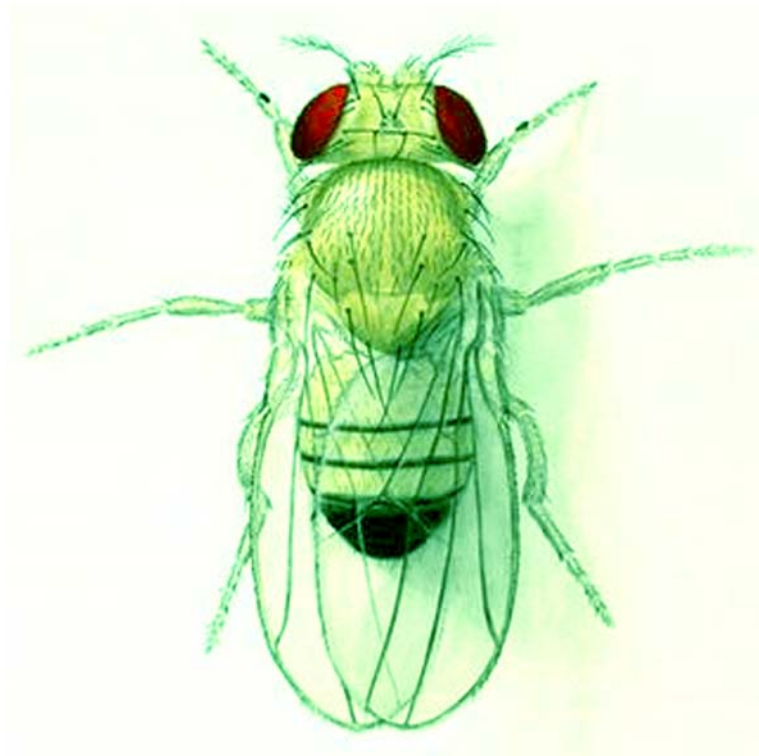


Figura 44. Tamaño de la bolsa alar. En gris se representa el tamaño medio de la bolsa alar de los discos imaginales control. En rojo se representa el tamaño medio de la bolsa alar de los discos imaginales en una situación de restricción de dieta. Las barras de error representan el error estándar. n.s significa que no hay diferencias estadísticamente significativas en una T-Student.

Todos estos resultados sugieren una vez más que dSparc es un marcador específico de la competición celular y además es un inhibidor específico de la eliminación de clones perdedores durante la competición celular.

DISCUSIÓN



1. dSparc es el primer protector específico de competición celular

Uno de los problemas que presenta actualmente el estudio de la competición celular es la ausencia de marcadores específicos. Hasta ahora, para estudiar la competición celular se han utilizado marcadores generales de apoptosis como la activación de la caspasa 3 (Moreno y cols. 2002a). También se han usado marcadores de estrés como la JNK a través de la presencia de mayores niveles de puckerred (puc-LacZ) (Martín-Blanco y cols. 1998; Moreno y cols. 2002a). La inexistencia de marcadores específicos ha dificultado el estudio de este proceso en organismos superiores.

Recientemente hemos identificado la proteína de membrana Fwe como componente de la maquinaria de respuesta de competición celular que se requiere para marcar a las células como ganadoras o perdedoras (Rhiner y cols. 2010).

Además en este trabajo se demuestra que dSparc es también un marcador de competición celular que aumenta su expresión en las células perdedoras, y lo que es más importante, es el primer protector específico de competición celular ya que inhibe apoptosis inducida por competición celular.

También se demuestra que Fwe y dSparc, los dos marcadores de competición celular recién descubiertos, no actúan en la misma ruta aunque como hemos visto, ambos tienen una función opuesta en competición celular.

Estos hallazgos son importantes porque al ser marcadores específicos de competición celular permiten descubrir otros sistemas en los que la competición celular tiene lugar. Además cada vez hay más datos que sugieren que la competición celular está conservada en mamíferos (Bondar y Medzhitov 2010; Tamori y cols. 2010; Oliver y cols. 2004; Oertel y cols. 2006; Sansom y cols. 2007).

Si la función de dSparc durante la competición celular en *Drosophila melanogaster* está conservada, permitiría estudiar más fácilmente este proceso en mamíferos, su posible relación con el cáncer y podría ayudar a entender la expresión diferencial de SPARC que se ha observado en tumores (Arnold y Brekken 2009).

2. Competición celular fisiológica

La retina pupal es un escenario de muerte celular fisiológico. A las 36h después de la formación del pupario se puede observar un anillo de células apoptóticas en la periferia del ojo (Wolff y Ready 1991). Estas células en el margen del campo de omatidios son fotorreceptores (R), células cono y células pigmentarias (Wolff y Ready 1991; Hay y cols. 1994). Se ha propuesto que las células del margen mueren por apoptosis porque forman omatidios incompletos. La apoptosis depende de la activación de genes proapoptóticos *hid*, *rpr* y *grim*, que es inducida por Wingless (Wg) (Lin y cols. 2004).

Esta apoptosis se inhibe sobreexpresando dSparc y el ARNi de *fwe* de la misma manera que bloqueando apoptosis con p35. Lo que sugiere que esta apoptosis es inducida por competición celular. La expresión de Fwe^{Lose} en las células del margen apoya esta hipótesis.

Por lo tanto, aunque estos son datos preliminares, sugieren que la apoptosis del margen de la retina pupal intermedia-tardía se debe a una eliminación de células mediada por competición celular.

Estos resultados son muy importantes porque es la primera vez que se describe un papel fisiológico para la competición celular.

Pero, ¿por qué las células del margen son eliminadas? Se ha propuesto que estas células se eliminan porque al estar en el margen no son capaces de reclutar todas las células necesarias para formar un omatidio completo, y que la presencia de omatidios incompletos en el margen de la retina perjudica la visión periférica de los individuos (Lin y cols. 2004). Tampoco se sabe cómo se activa la expresión de Wg en las células del margen. Se ha hipotetizado que se debe al fallo en la formación de sinapsis entre las neuronas (R) y sus dianas en el ganglio óptico. Quizás los fotorreceptores de los omatidios del margen no pueden encontrar suficientes dianas post-sinápticas porque están en el margen del campo de omatidios. La ausencia de una señal retrógrada desde las neuronas del ganglio óptico podría llevar a la acumulación de Wg en los omatidios de la periferia (Lin y cols. 2004).

Si esta eliminación de células del margen de la retina ocurre por competición celular, ¿Cómo se induce? La expresión de Wg y dMyc en el disco

imaginal de ala es complementaria, si en la retina pupal ocurre lo mismo, esta competición celular podría ser inducida por diferentes niveles de dMyc. Pero en el disco de ala esa diferencia endógena de dMyc no induce competición celular. Esto podría ocurrir porque en la zona no proliferativa no hay competición porque no hay división, o porque las células con diferentes niveles de dMyc no están en contacto sino que están separadas por los pliegues del disco, o porque las células que expresan Wg y niveles más bajos de dMyc están fuera de la bolsa alar. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que Wg tiene funciones opuestas en el disco imaginal de ala, donde actúa como factor de supervivencia, y en la retina pupal donde induce la expresión de genes proapoptóticos.

3. Proteínas solubles

Las células S2 de *Drosophila melanogaster* también han contribuido a dar con mecanismos implicados en competición celular. Se ha descrito que cuando se mezclan dos poblaciones de células S2 con diferentes niveles de expresión de *dmyc*, se producen interacciones celulares similares a las que tienen lugar en el disco imaginal de ala cuando se induce competición celular. Se ha propuesto que las dos poblaciones participan y son necesarias en el proceso competitivo por liberar factores solubles en el medio (Senoo-Matsuda y Johnston 2007).

En nuestro laboratorio hemos observado que dSparc aumenta su expresión en células crecidas en medio sin suero y se secreta al medio donde ejerce su función protectora. También hemos visto que una molécula secretada participa en el proceso como señal de muerte (KS) que induce apoptosis en las células, pero aún no se conoce la identidad de esta molécula.

Un posible candidato podría ser *egr*, el ligando de la superfamilia TNF (factor de necrosis tumoral) en *Drosophila*. Egr es endocitado por las células, induce la ruta JNK que desencadena apoptosis y se activa por desequilibrios en la señalización de Dpp (Igaki y cols. 2002; Moreno y cols. 2002b; Igaki y cols. 2009). Pero como se ha observado en experimentos anteriores, la

sobreexpresión de *egr* no afecta a la expresión de dSparc y su inhibición mediante un *ARNi* no elimina o atenúa la expresión de dSparc.

Aún no sabemos si las células S2 en condiciones de falta de suero mueren por competición celular. No sabemos si todas las células tienen la misma falta de factores de supervivencia, si los internalizan con la misma eficiencia, ni si expresan Fwe^{Lose} , pero aumentan la expresión dSparc que es un marcador específico de competición celular, y esa sobreexpresión protege a las células de ser eliminadas por apoptosis. También hemos observado que dSparc no protege a las células S2 de apoptosis inducida por irradiación de la misma manera que ocurre en el disco imaginal de ala.

Aún no se conoce el mecanismo mediante el cual dSparc protege a las células S2. Podría ser neutralizando la KS directamente en el espacio extracelular, o bien activando una ruta de señalización protectora que contrarrestara los efectos de la KS.

4. dSparc, Fwe y Ca^{2+}

Los resultados obtenidos sugieren que dSparc y Fwe actúan en rutas independientes durante la competición celular y tienen papeles opuestos (Figura 45). Pero tienen un elemento en común: el calcio.

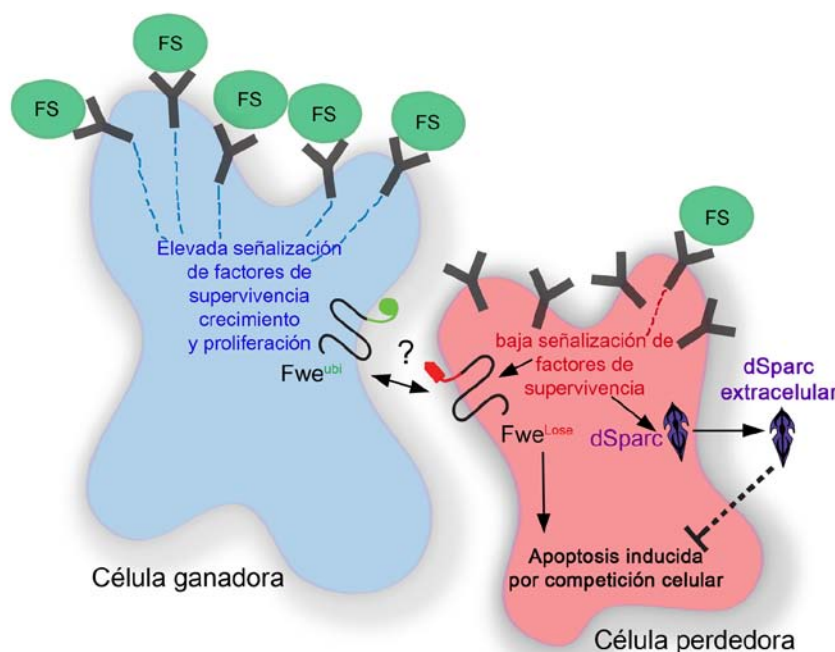


Figura 45. dSparc y Fwe. Ambos son marcadores de competición celular y juegan un papel durante la competición celular en las células perdedoras, pero los resultados obtenidos en el disco imaginal de ala de *Drosophila* sugieren que dSparc y Fwe actúan en rutas independientes y ejercen papeles opuestos en competición celular.

Se ha descrito

que el producto de Fwe^{Lose-A} es un canal de calcio con una función en la endocitosis durante las sinapsis que tienen lugar en el sistema nervioso de *Drosophila* (Yao y cols. 2009). Y se sabe que dSparc tiene un dominio de unión a calcio de elevada afinidad (Dominio III) y otro de baja afinidad (Dominio I) (Martinek y cols. 2002). Hasta la fecha, el papel del Ca^{2+} en la muerte celular todavía se debate (Cerella y cols. 2010).

La sobrecarga de Ca^{2+} induce estrés y produce necrosis (de Leiris y Boucher 1990; Qian y cols. 1999; Criddle y cols. 2007) y el aumento regulado de Ca^{2+} tiene un papel en la señalización de la ruta de intrínseca de apoptosis (Nutt y cols. 2002a; Nutt y cols. 2002b; Cerella y cols. 2007) (Figura 46).

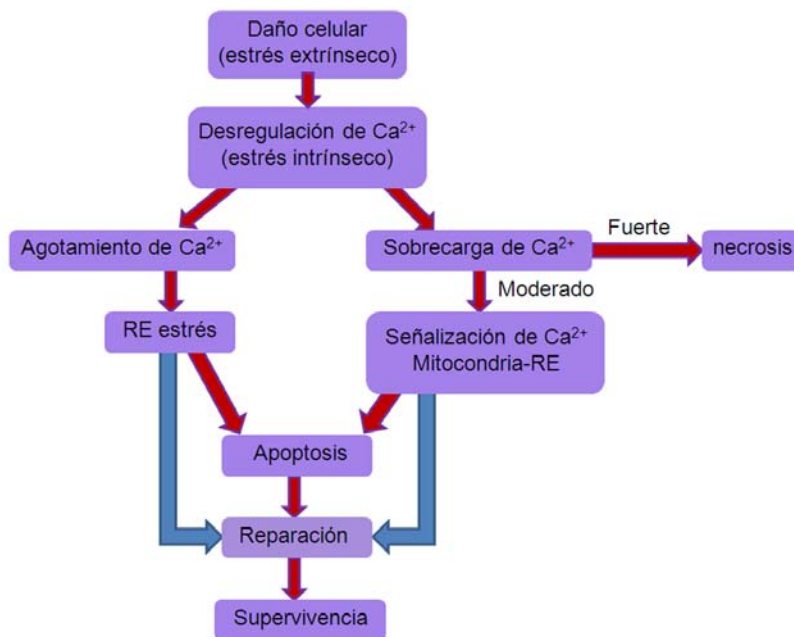


Figura 46. La compleja relación entre Ca^{2+} y la muerte celular. La señalización de Ca^{2+} en supervivencia y apoptosis versus desregulación de la homeostasis de Ca^{2+} como un evento necrogénico (Modificado de (Cerella y cols. 2010)). Diferentes papeles de las alteraciones de Ca^{2+} en supervivencia o muerte de células dañadas.

Teniendo estos datos presentes, una posibilidad sería que en situaciones de competición celular aumentaran los niveles de calcio extracelular, las células perdedoras que expresaran altos niveles de Fwe^{Lose} internalizarían mas Ca^{2+} y morirían. Puesto que durante la competición celular las células perdedoras aumentan la expresión de dSparc, éste podría unirse a calcio y lo neutralizaría permitiendo la supervivencia de las células perdedoras, al menos temporalmente.

Otra posibilidad sería que en una situación de competición celular, hubiera un mecanismo por el cual se indujera la exposición de Fwe^{Lose} en la membrana de las células perdedoras y desde ese momento comenzarían a internalizar el calcio que se encuentra en el medio por ese canal, y finalmente morirían. Esta situación también podría ser retrasada o revertida mediante la sobreexpresión de dSparc que podría unirse a calcio y lo neutralizaría permitiendo la supervivencia de las células perdedoras.

5. dSparc, competición celular y cáncer

La competición celular se ha propuesto como mecanismo que funciona en las etapas tempranas del cáncer (Rhiner y Moreno 2009), como por ejemplo en la formación de campos precancerosos. Si en una célula ocurriera una mutación que le diera una ventaja convirtiéndola en una supercompetidora (Ej: mutaciones en *myc*), podría desplazar paulatinamente a las células silvestres del tejido, de esta forma estas células mutadas podrían expandirse por el tejido generando un campo precanceroso en el que, si tuvieran lugar mutaciones adicionales que afectaran a oncogenes o genes supresores de tumores, se podría generar un tumor.

Hay evidencias de que la competición celular está conservada en mamíferos (Bondar y Medzhitov 2010; Tamori y cols. 2010; Oliver y cols. 2004; Oertel y cols. 2006; Sansom y cols. 2007). La posibilidad de detectar los campos precancerosos es muy importante porque uno de los problemas del cáncer es que el mínimo tamaño clínicamente detectable que los patólogos identifican como un tumor pequeño se encuentra muy cerca del tamaño máximo de un tumor compatible con la vida (diez rondas de división) (Moreno 2008).

Por lo tanto, puesto que dSparc es un marcador de competición celular en *Drosophila melanogaster*, si su función está conservada en mamíferos, podría permitir la detección de los campos precancerosos y por tanto una detección mucho más temprana del cáncer.

6. dSparc en tumores

La expresión de dSparc en mamíferos se ha visto ligada a muchos tipos de tumores. Se han descrito muchos tipos de cáncer que tienen la expresión de dSparc alterada (Framson y Sage 2004; Clark y Sage 2008; Podhajcer y cols. 2008), sin embargo los datos publicados sobre la función de SPARC durante la formación de tumores son inconsistentes y a menudo contradictorios. Incluso entre los mismos tipos de tumores, parece que la capacidad de SPARC de promover o inhibir la progresión tumoral depende del tipo celular que lo inicia, del estadio tumoral y de su microambiente.

Se han descrito múltiples tipos de tumores en los que SPARC actúa como promotor de tumores, como por ejemplo:

Cáncer de vejiga, leucemia, glioblastoma, astrocitoma, meningioma, cáncer de esófago y de mama entre otros (Rempel y cols. 1999; Huang y cols. 2000; Hedvat y cols. 2003; Martinez y cols. 2003; Brabender y cols. 2005; Nimphius y cols. 2007; Pen y cols. 2007; Helleman y cols. 2008).

Se han descrito múltiples tipos de tumores en los que SPARC parece tener una función como supresor tumoral como por ejemplo:

Cáncer de ovario, colorectal, de células pequeñas y no pequeñas de pulmón, páncreas, próstata y cáncer de útero (Sato y cols. 2003; Suzuki y cols. 2005; Wang y cols. 2005; Sova y cols. 2006; Rodriguez-Jimenez y cols. 2007; Yang y cols. 2007; Brune y cols. 2008; Cheetham y cols. 2008; Hong y cols. 2008; Socha y cols. 2009).

SPARC puede afectar a la progresión tumoral a diferentes niveles. Durante las etapas tempranas parece estar implicado en transformación y malignización (Robert y cols. 2006), también juega un papel relevante en la transición epitelio-mesénquima (Robert y cols. 2006; Sosa y cols. 2007), SPARC es producido por las células tumorales o por el microambiente dependiendo del tipo de tumor. Está involucrado en el escape del tumor de la respuesta inmune y promueve angiogénesis (Ledda y cols. 1997; Sangaletti y cols. 2003; Alvarez y cols. 2005; Lau y cols. 2006; Prada y cols. 2007), también está involucrado en la agresividad de las metástasis (Jacob y cols. 1999; Minn y cols. 2005; Campo McKnight y cols. 2006). Podría tener una función en metástasis que permitiría a

las células cancerosas permanecer y colonizar nuevos tejidos por un proceso de competición celular.

Para generar un tumor son necesarias un mínimo de tres a doce mutaciones diferentes dependiendo del tipo celular y del tumor (Merlo y cols. 2006). Hay muchos tipos de tumores diferentes dependiendo del tejido y también del tipo de mutaciones que han sufrido. Existe la posibilidad de que la expresión diferencial de SPARC en tumores se debiera al tipo de tumor y al estadio tumoral (Arnold y Brekken 2009).

Teniendo en cuenta los datos de dSparc obtenidos en *Drosophila melanogaster*, los tumores podrían clasificarse en dos grupos dependiendo de si las mutaciones iniciales que han sufrido las células les confieren alguna ventaja sobre las células silvestres circundantes o no.

6.1. Tumores supercompetidores

Un primer grupo de tumores estaría formado por los que se comportan como supercompetidores (Figura 47). Estos serían tumores con mutaciones que produzcan ventajas como por ejemplo mutaciones que incrementaran los niveles de expresión de *myc*. En estos casos la expresión de SPARC se vería incrementada en el tejido sano que rodea el tumor.

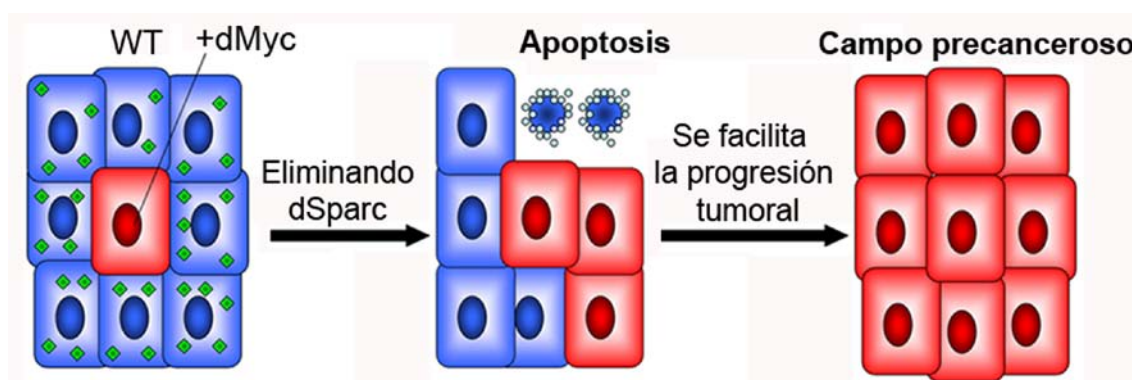


Figura 47. Tumores supercompetidores. Tumor tipo *myc*: Células supercompetidoras se expanden eliminando a las células normales circundantes. En ausencia de SPARC se facilita la progresión tumoral. Sobreexpresando SPARC en el tejido sano circundante se podría frenar la expansión de las células precancerosas.

Por ejemplo, se han detectado elevados niveles de SPARC en tejido normal comparado con las áreas tumorales en adenocarcinomas esofágicos, adenocarcinoma ductal y neoplasia mucinosa cística de páncreas (mucinous cystic neoplasia of the páncreas) (Mantoni y cols. 2008).

6.2. Tumores subóptimos

En *Drosophila melanogaster* hemos observado que hay mutaciones que inducen competición celular, entre ellas las que se producen en genes que afectan a la polaridad ápico-basal como *scrib*, *lgl* y *dlg*. Las células con estas mutaciones se comportan como perdedoras. Además se utilizan como modelo de tumoral y de metástasis en *Drosophila*, ya que células mutantes para *scrib* o *lgl* que sobreexpresan *ras*^{v12} son capaces de generar un tumor y que además produce metastásis (Wu y cols. 2010).

Un segundo grupo estaría formado por tumores con este tipo de mutaciones, que producen desventajas (como por ejemplo del tipo *lgl*^{-/-} en *Drosophila*). En este caso serían las células tumorales las que incrementarían la expresión de SPARC para intentar permanecer en el tejido. En este tipo de tumores se podría utilizar como terapia la inhibición de SPARC ya que de esta manera se disminuiría la viabilidad del tumor (Figura 48).

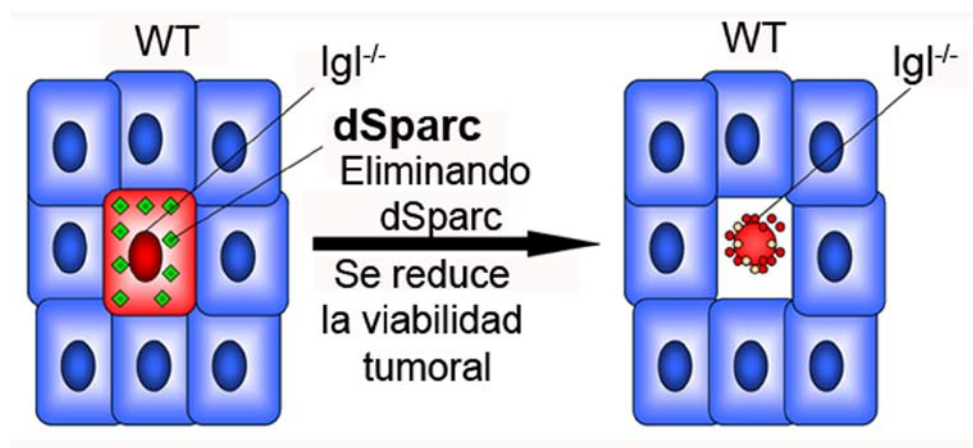


Figura 48. Tumores subóptimos. Tumor tipo *lgl*: estos tumores tendrían alguna desventaja respecto al tejido normal circundante y activarían SPARC. Eliminando la expresión de SPARC en las células tumorales se reduciría la viabilidad tumoral.

6.3. Metástasis

En las metástasis se ha encontrado un incremento en los niveles de expresión de SPARC (Minn y cols. 2005; Clark y Sage 2008). Por ejemplo en metástasis en el pulmón derivadas de cáncer de mama (Minn y cols. 2005).

El incremento de expresión de SPARC podría ayudar a las células tumorales a permanecer y facilitar su establecimiento en nuevos tejidos.

Si SPARC es necesario para la supervivencia de las células cancerosas cuando migran a otro tejido, se podrían diseñar estrategias que eliminaran su expresión. Inhibiendo SPARC se reduciría la capacidad de las células tumorales para colonizar y expandirse por nuevos tejidos.

6.4. Terapias

Si la función de dSparc en *Drosophila melanogaster* está conservada en mamíferos, SPARC podría ser un buen candidato para ser utilizado como biomarcador específico de las células tumorales, esto podría ayudar a una detección temprana del cáncer, además se podría tener en cuenta como diana terapéutica.

En los tumores subóptimos se podría utilizar como terapia la inhibición de SPARC ya que de esta manera se disminuiría la viabilidad del tumor, y se favorecería su eliminación por parte del tejido sano circundante.

En los tumores supercompetidores SPARC podría utilizarse como terapia ya que como se ha demostrado, dSparc protege a las células perdedoras inhibiendo su eliminación por competición celular. Sobreexpresando SPARC en el tejido que rodea al tumor se podría frenar la colonización del mismo por las células supercompetidoras, ya que al no poder eliminar el tejido sano circundante, estas no se podrían expandir.

Aunque la sobreexpresión de SPARC como terapia podría ser un arma de doble filo ya que se ha descrito que SPARC incrementa la expresión de metaloproteasas que son necesarias para la degradación de la lámina basal en mamíferos (MMPs, (McClung y cols. 2007)), estimula angiogénesis (Ledda y cols. 1997; Sangaletti y cols. 2003; Alvarez y cols. 2005; Lau y cols. 2006; Prada y cols. 2007) y está involucrado en la transición epitelio-mesénquima

mediante la inhibición de la expresión de cadherina-E (Robert y cols. 2006; Sosa y cols. 2007).

Durante los últimos años se han dirigido notables esfuerzos a la investigación y aplicación de nanopartículas de oro (AuNPs) en la detección precoz, diagnóstico y tratamiento del cáncer (Paciotti y cols. 2004; Jain y cols. 2008). Las nanopartículas de oro (AuNPs) pueden ser producidas con distintos tamaños y formas, y pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético...) (Bhattacharya y Mukherjee 2008; Jain y cols. 2008), y pueden atacar a los tumores sin afectar al tejido sano colindante (Chanda y cols. 2010).

Las AuNPs presentan un extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos en el tratamiento del cáncer (al ser activadas en presencia de luz láser, desprenden calor), así como para la elaboración de nanoestructuras útiles para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas (Bhattacharya y Mukherjee 2008; Jain y cols. 2008), un buen candidato podría ser SPARC.

También destaca la utilidad de las AuNPs en la elaboración de sistemas transportadores inteligentes que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya que ésta es desencadenada por un estímulo biológico interno (Gunnarsdottir y cols. 2002; Hong y cols. 2006) o por activación de un estímulo externo (por ejemplo luz láser) (Han y cols. 2006a; Han y cols. 2006b).

Las nanopartículas de oro permiten la unión de múltiples agentes de interés biomédico. Por ejemplo, agentes de direccionamiento o permeabilizantes de la membrana, que permiten dirigir el fármaco a su sitio de acción de forma selectiva, o introducirlo dentro de la célula si la actividad del fármaco lo requiere. También se pueden unir con hebras de ácido ribonucleico de interferencia (siRNA), capaces de silenciar determinados genes (Davis y cols. 2010), por ejemplo se podría silenciar SPARC en grupo de los tumores subóptimos, lo que podría reducir su viabilidad. Esto también permitiría inhibir tanto la proliferación como la supervivencia de las células tumorales,

deteniendo su crecimiento, sin que esto afecte a otras células sanas (Castillo y cols. 2008; Fernandez-Montesinos y cols. 2009). O bien inhibir promotores tumorales expresados específicamente en las células malignizadas (Davis y cols. 2010).

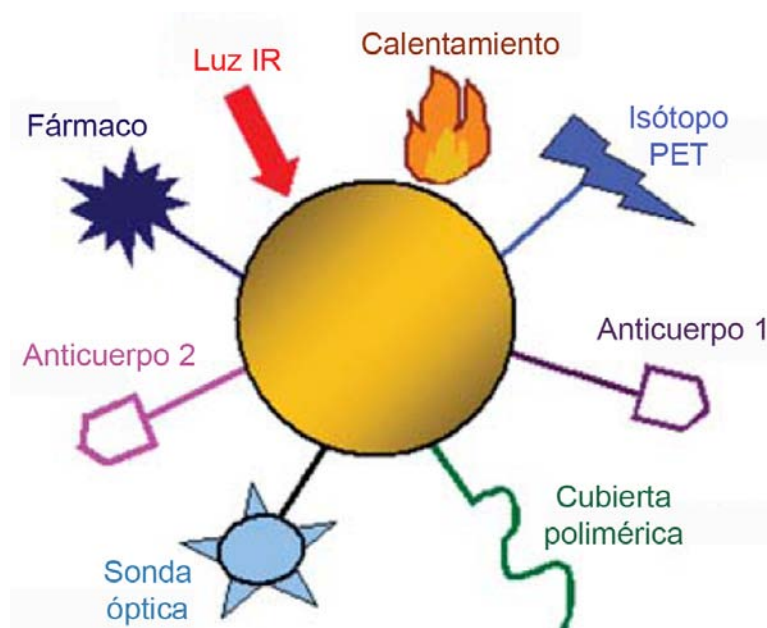


Figura 49. Nanopartícula de oro multifuncional que incorpora ligandos de vectorización, diagnóstico por imagen y entidades terapéuticas entre otros. En el esquema se incluye el calentamiento de la nanopartícula (efecto hipertérmico) desencadenado por una fuente de radiación luminosa (láser). Únicamente son necesarios los componentes seleccionados para cada aplicación.

El desarrollo de un nanosistema terapéutico basado en AuNPs, que pueda ser dirigido al lugar adecuado y activado desde el exterior por una fuente luminosa apropiada (rayos láser), ofrece muchas ventajas en el tratamiento del cáncer por dos posibles mecanismos: (a) efecto hipertérmico localizado de las AuNPs y; (b) liberación de un posible fármaco antitumoral asociado a las AuNPs, como consecuencia de la incidencia de luz láser (El ARNi de SPARC podría ser un buen candidato en el caso de los tumores subóptimos y también en las metástasis que tienen la expresión de SPARC incrementada).

Las AuNPs pueden ser funcionalizadas con anticuerpos (biomarcadores moleculares específicos sobreexpresados en la superficie de las células cancerígenas) que se unan específicamente a las células tumorales (En este caso se podría utilizar SPARC como marcador). Las AuNPs pueden ser detectadas en muestras biológicas y tejidos utilizando una gran variedad de métodos: microscopía electrónica, de campo oscuro, láser de barrido,

tomografía óptica, espectroscopía Raman, imagen de Raxos X, etc. (Eghtedari y cols. 2009). La irradiación externa de las células tumorales selectivamente marcadas con las AuNPs con un láser de frecuencia adecuada al máximo de absorción de las AuNPs resulta en un calentamiento selectivo (40-80 °C) que da lugar a un daño celular irreversible y a la desorganización de los componentes tisulares, a unas potencias láser muy inferiores a las requeridas para destruir las células sanas (Loo y cols. 2005; El-Sayed y cols. 2006; Huang y cols. 2006a; Huang y cols. 2006b; Chen y cols. 2007; Huang y cols. 2007).

7. dSparc, obesidad y cáncer

La obesidad tiene lugar debido a desequilibrios entre el consumo y el gasto de energía (Kopelman 2000). Se representa como una acumulación excesiva de tejido adiposo blanco que es resultado de un incremento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) y de su número (Rosen y Spiegelman 2000). Los adipocitos derivan de células madre mesenquimales, en la primera fase de la adipogénesis se determinan como preadipocitos y en una segunda fase llamada diferenciación terminal los preadipocitos se diferencian a adipocitos (Gregoire y cols. 1998). En individuos obesos se produce resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Kahn y Flier 2000; Kopelman 2000).

Se ha descrito que SPARC aumenta su expresión en los adipocitos de individuos obesos (Tartare-Deckert y cols. 2001). En el embrión de *Drosophila* se ha observado que dSparc se expresa en el cuerpo graso (Martinek y cols. 2008). SPARC inhibe adipogénesis, también la diferenciación terminal y disminuye la deposición del tejido adiposo blanco. Por eso los ratones SPARC^{-/-} tienen mayores depósitos de grasa. Normalmente los lípidos se acumulan en los adipocitos, y cuando la célula alcanza un tamaño determinado se diferencian, y se activa la proliferación de preadipocitos. En los ratones SPARC^{-/-} los adipocitos alcanzan un tamaño mayor y además se produce hiperplasia en el tejido (Nie y Sage 2009).

En *Drosophila*, en condiciones de disponibilidad de nutrientes, los DILPs (*Drosophila Insulin-like Peptides*) y los nutrientes señalizan a través de las rutas de la Insulina y TOR (*Target of Rapamycin*) respectivamente, esto resulta en la

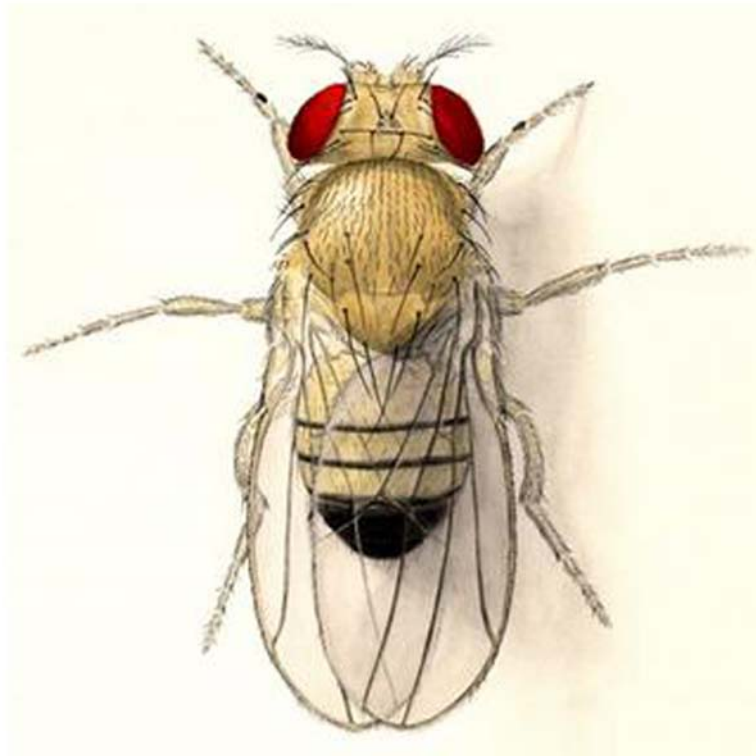
retención de FOXO en el citoplasma y un aumento de traducción que conlleva crecimiento. Azúcares y ácidos grasos se almacenan como glucógeno y triacilglicerol, mientras tanto las rutas metabólicas encargadas de producir energía se encuentran inhibidas. Sin embargo, cuando la disponibilidad de nutrientes es limitada, como por ejemplo en una situación de restricción de dieta, la ruta de la Insulina y TOR están atenuadas, FOXO se transloca al núcleo, se reduce la síntesis protéica y se restringe el crecimiento. Se moviliza el glucógeno y triacilglicerol mediante la actividad de AKH (*insect adipokinetic hormone*) y lipasas, mientras las rutas metabólicas encargadas de producir energía están activas (revisado en (Baker y Thummel 2007)).

En condiciones de restricción de dieta en *Drosophila* se inhibe la competición celular, y se atenúa la expresión de dSparc.

Existe una relación entre obesidad y cáncer. El sobrepeso y la obesidad son la segunda causa más frecuente de cáncer después del consumo de tabaco. El sobrepeso y la obesidad causan el 20% de los cánceres detectados (Wolin y cols. 2010).

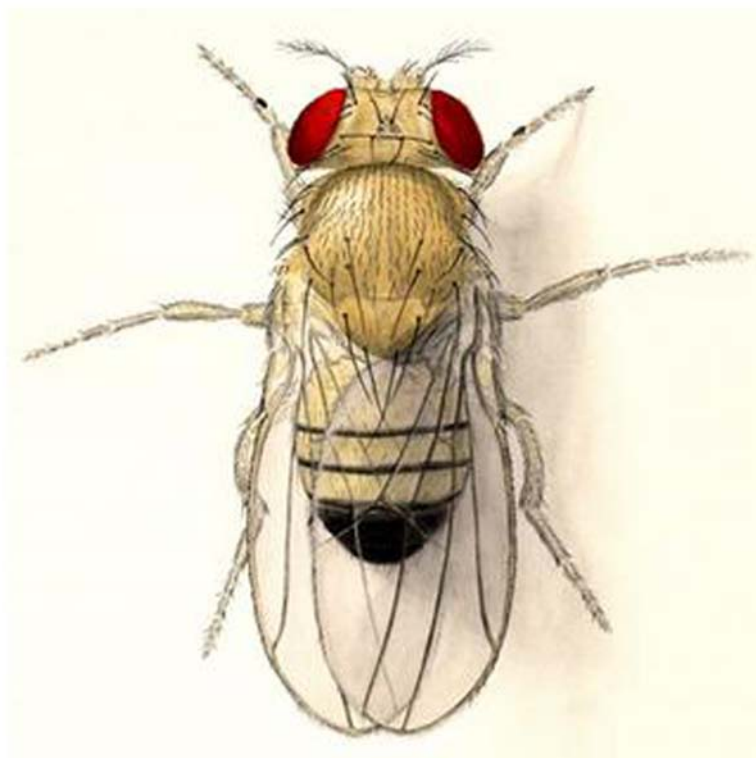
Sería interesante profundizar en el estudio del papel de SPARC en la obesidad, dada la relación de ambos con el cáncer.

CONCLUSIONES



1. dSparc aumenta su expresión en las células perdedoras durante la competición celular.
2. dSparc es un marcador específico de competición celular y no de apoptosis: El aumento de expresión de dSparc ocurre específicamente durante la competición celular.
3. El incremento de expresión de dSparc en competición celular depende de Dpp.
4. dSparc protege a las células perdedoras de la competición celular bloqueando la activación de caspasa 3 (inhibiendo apoptosis).
5. dSparc no es un inhibidor general de apoptosis, su papel es específico de competición celular.
6. Primer papel fisiológico de la competición celular: La apoptosis que tiene lugar en el margen de la retina pupal media-tardía.
7. dSparc protege a las células S2 de una señal de muerte (KS). dSparc es secretado al medio donde ejerce su efecto protector neutralizando el KS o activando una ruta protectora que contrarresta los efectos del KS.
8. dSparc y Fwe actúan en diferentes rutas de competición celular y tienen papeles opuestos.

BIBLIOGRaFía



Abbott, M. K. y J. A. Lengyel (1991). "Embryonic head involution and rotation of male terminalia require the *Drosophila* locus head involution defective." *Genetics* 129(3): 783-9.

Adachi-Yamada, T., K. Fujimura-Kamada, Y. Nishida y K. Matsumoto (1999). "Distorsion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing." *Nature* 400: 166-169.

Adachi-Yamada, T. y M. B. O'Connor (2002). "Morphogenetic apoptosis: a mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients." *Dev Biol* 251(1): 74-90.

Adam, G., N. Perrimon y S. Noselli (2003). "The retinoic-like juvenile hormone controls the looping of left-right asymmetric organs in *Drosophila*." *Development* 130(11): 2397-406.

Adams, M. D., S. E. Celniker, y cols. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science* 287(5461): 2185-95.

Alvarez, M. J., F. Prada, E. Salvatierra, A. I. Bravo, V. P. Lutzky, C. Carbone, F. J. Pitossi, H. E. Chuluyan y O. L. Podhajcer (2005). "Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity." *Cancer Res* 65(12): 5123-32.

Arnold, S. A. y R. A. Brekken (2009). "SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis." *J Cell Commun Signal* 3(3-4): 255-73.

Baker, K. D. y C. S. Thummel (2007). "Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*." *Cell Metab* 6(4): 257-66.

Baker, N. E. y W. Li (2008). "Cell competition and its possible relation to cancer." *Cancer Res* 68(14): 5505-7.

Bhattacharya, R. y P. Mukherjee (2008). "Biological properties of "naked" metal nanoparticles." *Adv Drug Deliv Rev* 60(11): 1289-306.

Best, C. J., J. W. Gillespie, Y. Yi, G. V. Chandramouli, M. A. Perlmutter, Y. Gathright, H. S. Erickson, L. Georgevich, M. A. Tangrea, P. H. Duray, S. Gonzalez, A. Velasco, W. M. Linehan, R. J. Matusik, D. K. Price, W. D. Figg, M. R. Emmert-Buck y R. F. Chuaqui (2005). "Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy." *Clin Cancer Res* 11(19 Pt 1): 6823-34.

Blair, S. S. (2003). "Genetic mosaic techniques for studying *Drosophila* development." *Development* 130(21): 5065-72.

Bohni, R., E. J. Riesgo, S. Oldham, W. Brogiolo, H. Stocker, B. F. Andruss, K. Beckingham y E. Hafen (1999). "Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a Drosophila homolog of vertebrate IRS1-4." *Cell* 97(7): 865-75.

Bondar, T. y R. Medzhitov (2010) "p53-mediated hematopoietic stem and progenitor cell competition." *Cell Stem Cell* 6(4): 309-22.

Bornstein, P. (1995). "Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1." *J Cell Biol* 130(3): 503-6.

Boutros, M. y J. Ahringer (2008). "The art and design of genetic screens: RNA interference." *Nat Rev Genet* 9(7): 554-66.

Brabender, J., P. Marjoram, R. V. Lord, R. Metzger, D. Salonga, D. Vallbohmer, H. Schafer, K. D. Danenberg, P. V. Danenberg, F. M. Selaru, S. E. Baldus, A. H. Holscher, S. J. Meltzer y P. M. Schneider (2005). "The molecular signature of normal squamous esophageal epithelium identifies the presence of a field effect and can discriminate between patients with Barrett's esophagus and patients with Barrett's-associated adenocarcinoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(9): 2113-7.

Brachmann, C. B. y R. L. Cagan (2003). "Patterning the fly eye: the role of apoptosis." *Trends Genet* 19(2): 91-6.

Bradshaw, A. D. y E. H. Sage (2001). "SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury." *J Clin Invest* 107(9): 1049-54.

Bradshaw, A. D., D. C. Graves, K. Motamed y E. H. Sage (2003a). "SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 6045-50.

Bradshaw, A. D., P. Puolakkainen, J. Dasgupta, J. M. Davidson, T. N. Wight y E. Helene Sage (2003b). "SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength." *J Invest Dermatol* 120(6): 949-55.

Brand, A. H. y N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* 118(2): 401-15.

Brown, C. J., S. Lain, C. S. Verma, A. R. Fersht y D. P. Lane (2009). "Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway." *Nat Rev Cancer* 9(12): 862-73.

Brumby, A. M. y H. E. Richardson (2003). "scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in Drosophila." *EMBO J* 22(21): 5769-79.

Brune, K., S. M. Hong, A. Li, S. Yachida, T. Abe, M. Griffith, D. Yang, N. Omura, J. Eshleman, M. Canto, R. Schulick, A. P. Klein, R. H. Hruban, C. Iacobuzio-Donohue y M. Goggins (2008). "Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(12): 3536-42.

Bucci, C., R. G. Parton, I. H. Mather, H. Stunnenberg, K. Simons, B. Hoflack y M. Zerial (1992). "The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway." *Cell* 70(5): 715-28.

Burke, R. y K. Basler (1996). "Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing Drosophila wing." *Development* 122: 2261-2269.

Calleja, M., E. Moreno, S. Pelaz y G. Morata (1996). "Visualization of gene expression in living adult Drosophila." *Science* 274(5285): 252-5.

Campbell, G. y A. Tomlinson (1999). "Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of Drosophila: regulation of Dpp targets by brinker." *Cell* 96(4): 553-62.

Campo McKnight, D. A., D. M. Sosnoski, J. E. Koblinski y C. V. Gay (2006). "Roles of osteonectin in the migration of breast cancer cells into bone." *J Cell Biochem* 97(2): 288-302.

Castillo, P. M., J. L. Herrera, R. Fernandez-Montesinos, C. Caro, A. P. Zaderenko, J. A. Mejias y D. Pozo (2008). "Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by Toll-like receptor ligands." *Nanomedicine (Lond)* 3(5): 627-35.

Cerella, C., C. Mearelli, S. Coppola, M. D'Alessio, M. De Nicola, M. Diederich y L. Ghibelli (2007). "Sequential phases of Ca²⁺ alterations in pre-apoptotic cells." *Apoptosis* 12(12): 2207-19.

Cerella, C., M. Diederich y L. Ghibelli (2010) "The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival." *Int J Cell Biol* 2010: 546163.

Clark, C. J. y E. H. Sage (2008). "A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment--where there's SPARC, there's fire." *J Cell Biochem* 104(3): 721-32.

Cohen, B., A. A. Simcox y S. M. Cohen (1993). "Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo." *Development* 117(2): 597-608.

Cordero, J. B. y R. L. Cagan (2010) "Canonical wingless signaling regulates cone cell specification in the *Drosophila* retina." *Dev Dyn* 239(3): 875-84.

Criddle, D. N., J. V. Gerasimenko, H. K. Baumgartner, M. Jaffar, S. Voronina, R. Sutton, O. H. Petersen y O. V. Gerasimenko (2007). "Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis?" *Cell Death Differ* 14(7): 1285-94.

Chanda, N., P. Kan, L. D. Watkinson, R. Shukla, A. Zambre, T. L. Carmack, H. Engelbrecht, J. R. Lever, K. Katti, G. M. Fent, S. W. Casteel, C. J. Smith, W. H. Miller, S. Jurisson, E. Boote, J. D. Robertson, C. Cutler, M. Dobrovolskaia, R. Kannan y K. V. Katti (2010) "Radioactive gold nanoparticles in cancer therapy: therapeutic efficacy studies of GA-198AuNP nanoconstruct in prostate tumor-bearing mice." *Nanomedicine* 6(2): 201-9.

Cheetham, S., M. J. Tang, F. Mesak, H. Kennecke, D. Owen y I. T. Tai (2008). "SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'deoxyctidine to increase SPARC expression and improve therapy response." *Br J Cancer* 98(11): 1810-9.

Chen, J., D. Wang, J. Xi, L. Au, A. Siekkinen, A. Warsen, Z. Y. Li, H. Zhang, Y. Xia y X. Li (2007). "Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells." *Nano Lett* 7(5): 1318-22.

Dang, C. V., L. M. Resar, E. Emison, S. Kim, Q. Li, J. E. Prescott, D. Wonsey y K. Zeller (1999). "Function of the c-Myc oncogenic transcription factor." *Exp Cell Res* 253(1): 63-77.

Davis, M. E., J. E. Zuckerman, C. H. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel y A. Ribas (2010) "Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles." *Nature* 464(7291): 1067-70.

de la Cova, C., M. Abril, P. Bellosta, P. Gallant y L. A. Johnston (2004). "*Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition." *Cell* 117(1): 107-16.

de Leiris, J. y F. Boucher (1990). "Ischemic myocardial cell necrosis: calcium overload or oxygen free-radicals?" *Rev Port Cardiol* 9(2): 153-8.

Delany, A. M., I. Kalajzic, A. D. Bradshaw, E. H. Sage y E. Canalis (2003). "Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival." *Endocrinology* 144(6): 2588-96.

Eghtedari, M., A. V. Liopo, J. A. Copland, A. A. Oraevsky y M. Motamedi (2009). "Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells." *Nano Lett* 9(1): 287-91.

El-Sayed, I. H., X. Huang y M. A. El-Sayed (2006). "Selective laser photothermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles." *Cancer Lett* 239(1): 129-35.

Entchev, E. V., A. Schwabedissen y M. Gonzalez-Gaitan (2000). "Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp." *Cell* 103(6): 981-91.

Ernst, J., G. J. Nau y Z. Bar-Joseph (2005). "Clustering short time series gene expression data." *Bioinformatics* 21 Suppl 1: i159-68.

Fearon, E. R. y C. V. Dang (1999). "Cancer genetics: tumor suppressor meets oncogene." *Curr Biol* 9(2): R62-5.

Fernandez-Montesinos, R., P. M. Castillo, R. Klippstein, E. Gonzalez-Rey, J. A. Mejias, A. P. Zaderenko y D. Pozo (2009). "Chemical synthesis and characterization of silver-protected vasoactive intestinal peptide nanoparticles." *Nanomedicine (Lond)* 4(8): 919-30.

Framson, P. E. y E. H. Sage (2004). "SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil?" *J Cell Biochem* 92(4): 679-90.

Gallant, P., Y. Shio, P. F. Cheng, S. M. Parkhurst y R. N. Eisenman (1996). "Myc and Max homologs in *Drosophila*." *Science* 274(5292): 1523-7.

Gilmour, D. T., G. J. Lyon, M. B. Carlton, J. R. Sanes, J. M. Cunningham, J. R. Anderson, B. L. Hogan, M. J. Evans y W. H. Colledge (1998). "Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens." *EMBO J* 17(7): 1860-70.

Gleichauf, R. (1936). Anatomie und Variabilität des Geschlechtapparates von *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Z.Wiss.Zool.* 148:1-66.

Glise, B., H. Bourbon y S. Noselli (1995). "hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement." *Cell* 83(3): 451-61.

Glise, B. a. N., S. (1997). "Coupling the Jun amini-terminal kinase and decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis." *Genes and Development* 11: 1738-1747.

Gregoire, F. M., C. M. Smas y H. S. Sul (1998). "Understanding adipocyte differentiation." *Physiol Rev* 78(3): 783-809.

Grether, M. E., J. M. Abrams, J. Agapite, K. White y H. Steller (1995). "The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death." *Genes Dev* 9(14): 1694-708.

Grzeschik, N. A., N. Amin, J. Secombe, A. M. Brumby y H. E. Richardson (2007). "Abnormalities in cell proliferation and apico-basal cell polarity are separable in *Drosophila* lgl mutant clones in the developing eye." *Dev Biol* 311(1): 106-23.

Gunnarsdottir, S., M. Rucki y A. A. Elfarra (2002). "Novel glutathione-dependent thiopurine prodrugs: evidence for enhanced cytotoxicity in tumor cells and for decreased bone marrow toxicity in mice." *J Pharmacol Exp Ther* 301(1): 77-86.

Han, G., C. T. Martin y V. M. Rotello (2006a). "Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents." *Chem Biol Drug Des* 67(1): 78-82.

Han, G., C. C. You, B. J. Kim, R. S. Turingan, N. S. Forbes, C. T. Martin y V. M. Rotello (2006b). "Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles." *Angew Chem Int Ed Engl* 45(19): 3165-9.

Hariharan, I. K. y D. Bilder (2006). "Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*." *Annu Rev Genet* 40: 335-61.

Hay, B. A., T. Wolff y G. M. Rubin (1994). "Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*." *Development* 120(8): 2121-9.

Hedvat, C. V., R. L. Comenzo, J. Teruya-Feldstein, A. B. Olshen, S. A. Ely, K. Osman, Y. Zhang, N. Kalakonda y S. D. Nimer (2003). "Insights into extramedullary tumour cell growth revealed by expression profiling of human plasmacytomas and multiple myeloma." *Br J Haematol* 122(5): 728-44.

Helleman, J., M. P. Jansen, K. Ruigrok-Ritstier, I. L. van Staveren, M. P. Look, M. E. Meijer-van Gelder, A. M. Sieuwerts, J. G. Klijn, S. Sleijfer, J. A. Foekens y E. M. Berns (2008). "Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response." *Clin Cancer Res* 14(17): 5555-64.

Herranz, H., G. Morata y M. Milan (2006). "calderon encodes an organic cation transporter of the major facilitator superfamily required for cell growth and proliferation of *Drosophila* tissues." *Development* 133(14): 2617-25.

- Hong, R., G. Han, J. M. Fernandez, B. J. Kim, N. S. Forbes y V. M. Rotello** (2006). "Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers." *J Am Chem Soc* 128(4): 1078-9.
- Hong, S. M., D. Kelly, M. Griffith, N. Omura, A. Li, C. P. Li, R. H. Hruban y M. Goggins** (2008). "Multiple genes are hypermethylated in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas." *Mod Pathol* 21(12): 1499-507.
- Huang, H., S. Colella, M. Kurrer, Y. Yonekawa, P. Kleihues y H. Ohgaki** (2000). "Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays." *Cancer Res* 60(24): 6868-74.
- Huang, X., I. H. El-Sayed, W. Qian y M. A. El-Sayed** (2006a). "Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods." *J Am Chem Soc* 128(6): 2115-20.
- Huang, X., P. K. Jain, I. H. El-Sayed y M. A. El-Sayed** (2006b). "Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells with the use of immunotargeted gold nanoparticles." *Photochem Photobiol* 82(2): 412-7.
- Huang, X., W. Qian, I. H. El-Sayed y M. A. El-Sayed** (2007). "The potential use of the enhanced nonlinear properties of gold nanospheres in photothermal cancer therapy." *Lasers Surg Med* 39(9): 747-53.
- Humbert, P. O., N. A. Grzeschik, A. M. Brumby, R. Galea, I. Elsum y H. E. Richardson** (2008). "Control of tumourigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module." *Oncogene* 27(55): 6888-907.
- Igaki, T., H. Kanda, Y. Yamamoto-Goto, H. Kanuka, E. Kuranaga, T. Aigaki y M. Miura** (2002). "Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway." *Embo J* 21(12): 3009-18.
- Igaki, T., R. A. Pagliarini y T. Xu** (2006). "Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in Drosophila." *Curr Biol* 16(11): 1139-46.
- Igaki, T., J. C. Pastor-Pareja, H. Aonuma, M. Miura y T. Xu** (2009). "Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in Drosophila." *Dev Cell* 16(3): 458-65.
- Jacob, K., M. Webber, D. Benayahu y H. K. Kleinman** (1999). "Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone." *Cancer Res* 59(17): 4453-7.

Jain, P. K., X. Huang, I. H. El-Sayed y M. A. El-Sayed (2008). "Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine." *Acc Chem Res* 41(12): 1578-86.

Jazwinska, A., N. Kirov, E. Wieschaus, S. Roth y C. Rushlow (1999). "The Drosophila gene brinker reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation." *Cell* 96(4): 563-73.

Johnston, L. A., D. A. Prober, B. A. Edgar, R. N. Eisenman y P. Gallant (1999). "Drosophila myc regulates cellular growth during development." *Cell* 98(6): 779-90.

Kahn, B. B. y J. S. Flier (2000). "Obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* 106(4): 473-81.

Kanda, H. y M. Miura (2004). "Regulatory roles of JNK in programmed cell death." *J Biochem (Tokyo)* 136(1): 1-6.

Klein, C. A. (2008). "Cancer. The metastasis cascade." *Science* 321(5897): 1785-7.

Kopelman, P. G. (2000). "Obesity as a medical problem." *Nature* 404(6778): 635-43.

Kuranaga, E., H. Kanuka, T. Igaki, K. Sawamoto, H. Ichijo, H. Okano y M. Miura (2002). "Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in Drosophila." *Nat Cell Biol* 4(9): 705-10.

Lane, T. F. y E. H. Sage (1994). "The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions." *FASEB J* 8(2): 163-73.

Lapointe, J., C. Li, J. P. Higgins, M. van de Rijn, E. Bair, K. Montgomery, M. Ferrari, L. Egevad, W. Rayford, U. Bergerheim, P. Ekman, A. M. DeMarzo, R. Tibshirani, D. Botstein, P. O. Brown, J. D. Brooks y J. R. Pollack (2004). "Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(3): 811-6.

Lau, C. P., R. T. Poon, S. T. Cheung, W. C. Yu y S. T. Fan (2006). "SPARC and Hevin expression correlate with tumour angiogenesis in hepatocellular carcinoma." *J Pathol* 210(4): 459-68.

Ledda, F., A. I. Bravo, S. Adris, L. Bover, J. Mordoh y O. L. Podhajcer (1997). "The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma." *J Invest Dermatol* 108(2): 210-4.

- Lin, H. V., A. Rogulja y K. M. Cadigan** (2004). "Wingless eliminates ommatidia from the edge of the developing eye through activation of apoptosis." *Development* 131(10): 2409-18.
- Loo, C., A. Lowery, N. Halas, J. West y R. Drezek** (2005). "Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy." *Nano Lett* 5(4): 709-11.
- Macias, A., N. M. Romero, F. Martin, L. Suarez, A. L. Rosa y G. Morata** (2004). "PVF1/PVR signaling and apoptosis promotes the rotation and dorsal closure of the *Drosophila* male terminalia." *Int J Dev Biol* 48(10): 1087-94.
- Manjon, C., E. Sanchez-Herrero y M. Suzanne** (2007). "Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for *Drosophila* leg morphogenesis." *Nat Cell Biol* 9(1): 57-63.
- Mantoni, T. S., R. R. Schendel, F. Rodel, G. Niedobitek, O. Al-Assar, A. Masamune y T. B. Brunner** (2008). "Stromal SPARC expression and patient survival after chemoradiation for non-resectable pancreatic adenocarcinoma." *Cancer Biol Ther* 7(11).
- Martín-Blanco, E., A. Gampel, J. Ring, K. Virdee, N. Kirov, A. M. Tolkovsky y A. A. Martinez** (1998). "puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*." *Genes Dev* 12(4): 557-70.
- Martinek, N., J. Shahab, M. Saathoff y M. Ringuette** (2008). "Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos." *J Cell Sci* 121(Pt 10): 1671-80.
- Martinek, N., R. Zou, M. Berg, J. Sodek y M. Ringuette** (2002). "Evolutionary conservation and association of SPARC with the basal lamina in *Drosophila*." *Dev Genes Evol* 212(3): 124-33.
- Martinez, N., F. I. Camacho, P. Algara, A. Rodriguez, A. Dopazo, E. Ruiz-Ballesteros, P. Martin, J. A. Martinez-Climent, J. Garcia-Conde, J. Menarguez, F. Solano, M. Mollejo y M. A. Piris** (2003). "The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival." *Cancer Res* 63(23): 8226-32.
- Marusyk, A., C. C. Porter, V. Zaberezhnyy y J. DeGregori** (2010). "Irradiation selects for p53-deficient hematopoietic progenitors." *PLoS Biol* 2;8(3): e1000324.
- McClung, H. M., S. L. Thomas, P. Osenkowski, M. Toth, P. Menon, A. Raz, R. Fridman y S. A. Rempel** (2007). "SPARC upregulates MT1-MMP

expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells." *Neurosci Lett* 419(2): 172-7.

McGuire, S. E., P. T. Le, A. J. Osborn, K. Matsumoto y R. L. Davis (2003). "Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*." *Science* 302(5651): 1765-8.

Mendis, D. B., G. O. Ivy y I. R. Brown (1998). "SPARC/osteonectin mRNA is induced in blood vessels following injury to the adult rat cerebral cortex." *Neurochem Res* 23(8): 1117-23.

Merlo, L. M., J. W. Pepper, B. J. Reid y C. C. Maley (2006). "Cancer as an evolutionary and ecological process." *Nat Rev Cancer* 6(12): 924-35.

Milán, M., L. Perez y S. M. Cohen (2002). "Short-range cell interactions and cell survival in the *Drosophila* wing." *Dev Cell* 2(6): 797-805.

Minn, A. J., G. P. Gupta, P. M. Siegel, P. D. Bos, W. Shu, D. D. Giri, A. Viale, A. B. Olshen, W. L. Gerald y J. Massague (2005). "Genes that mediate breast cancer metastasis to lung." *Nature* 436(7050): 518-24.

Morata, G. y P. Ripoll (1975). "Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate." *Dev Biol* 42(2): 211-21.

Moreno, E., K. Basler y G. Morata (2002a). "Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development." *Nature* 416(6882): 755-9.

Moreno, E., M. Yan y K. Basler (2002b). "Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily." *Curr Biol* 12(14): 1263-8.

Moreno, E. y K. Basler (2004). "dMyc transforms cells into super-competitors." *Cell* 117(1): 117-29.

Moreno, E. (2008). "Is cell competition relevant to cancer?" *Nat Rev Cancer* 8(2): 141-7.

Nie, J. y E. H. Sage (2009). "SPARC inhibits adipogenesis by its enhancement of beta-catenin signaling." *J Biol Chem* 284(2): 1279-90.

Nimphius, W., R. Moll, P. Olbert, A. Ramaswamy y P. J. Barth (2007). "CD34+ fibrocytes in chronic cystitis and noninvasive and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder." *Virchows Arch* 450(2): 179-85.

Norose, K., W. K. Lo, J. I. Clark, E. H. Sage y C. C. Howe (2000). "Lenses of SPARC-null mice exhibit an abnormal cell surface-basement membrane interface." *Exp Eye Res* 71(3): 295-307.

Nutt, L. K., J. Chandra, A. Pataer, B. Fang, J. A. Roth, S. G. Swisher, R. G. O'Neil y D. J. McConkey (2002a). "Bax-mediated Ca^{2+} mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis." *J Biol Chem* 277(23): 20301-8.

Nutt, L. K., A. Pataer, J. Pahler, B. Fang, J. Roth, D. J. McConkey y S. G. Swisher (2002b). "Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca^{2+} stores." *J Biol Chem* 277(11): 9219-25.

Oertel, M., A. Menthena, M. D. Dabeva y D. A. Shafritz (2006). "Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells." *Gastroenterology* 130(2): 507-20; quiz 590.

Oldham, S. y E. Hafen (2003). "Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control." *Trends Cell Biol* 13(2): 79-85.

Oliver, E. R., T. L. Saunders, S. A. Tarle y T. Glaser (2004). "Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute." *Development* 131(16): 3907-20.

Paciotti, G. F., L. Myer, D. Weinreich, D. Goia, N. Pavel, R. E. McLaughlin y L. Tamarkin (2004). "Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery." *Drug Deliv* 11(3): 169-83.

Pelengaris, S., M. Khan y G. Evan (2002). "c-MYC: more than just a matter of life and death." *Nat Rev Cancer* 2(10): 764-76.

Pen, A., M. J. Moreno, J. Martin y D. B. Stanimirovic (2007). "Molecular markers of extracellular matrix remodeling in glioblastoma vessels: microarray study of laser-captured glioblastoma vessels." *Glia* 55(6): 559-72.

Pierce, S. B., C. Yost, J. S. Britton, L. W. Loo, E. M. Flynn, B. A. Edgar y R. N. Eisenman (2004). "dMyc is required for larval growth and endoreplication in *Drosophila*." *Development* 131(10): 2317-27.

Podhajcer, O. L., L. G. Benedetti, M. R. Girotti, F. Prada, E. Salvatierra y A. S. Llera (2008). "The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host." *Cancer Metastasis Rev* 27(4): 691-705.

Prada, F., L. G. Benedetti, A. I. Bravo, M. J. Alvarez, C. Carbone y O. L. Podhajcer (2007). "SPARC endogenous level, rather than fibroblast-produced

SPARC or stroma reorganization induced by SPARC, is responsible for melanoma cell growth." *J Invest Dermatol* 127(11): 2618-28.

Qian, T., B. Herman y J. J. Lemasters (1999). "The mitochondrial permeability transition mediates both necrotic and apoptotic death of hepatocytes exposed to Br-A23187." *Toxicol Appl Pharmacol* 154(2): 117-25.

Read, R. D., W. K. Cavenee, F. B. Furnari y J. B. Thomas (2009). "A drosophila model for EGFR-Ras and PI3K-dependent human glioma." *PLoS Genet* 5(2): e1000374.

Reed, M. J., P. Puolakkainen, T. F. Lane, D. Dickerson, P. Bornstein y E. H. Sage (1993). "Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization." *J Histochem Cytochem* 41(10): 1467-77.

Reiter, L. T., L. Potocki, S. Chien, M. Gribskov y E. Bier (2001). "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*." *Genome Res* 11(6): 1114-25.

Rempel, S. A., S. Ge y J. A. Gutierrez (1999). "SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas." *Clin Cancer Res* 5(2): 237-41.

Rhiner, C., J. M. Lopez-Gay, D. Soldini, S. Casas-Tinto, F. A. Martin, L. Lombardia y E. Moreno (2010) "Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in *Drosophila*." *Dev Cell* 18(6): 985-98.

Rhiner, C. y E. Moreno (2009). "Super competition as a possible mechanism to pioneer precancerous fields." *Carcinogenesis* 30(5): 723-8.

Rhiner, C., B. Diaz, M. Portela, J. F. Poyatos, I. Fernandez-Ruiz, J. M. Lopez-Gay, O. Gerlitz y E. Moreno (2009). "Persistent competition among stem cells and their daughters in the *Drosophila* ovary germline niche." *Development* 136(6): 995-1006.

Robert, G., C. Gaggioli, O. Bailet, C. Chavey, P. Abbe, E. Aberdam, E. Sabatie, A. Cano, A. Garcia de Herreros, R. Ballotti y S. Tartare-Deckert (2006). "SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development." *Cancer Res* 66(15): 7516-23.

Rodriguez-Jimenez, F. J., T. Caldes, P. Iniesta, J. A. Vidart, J. L. Garcia-Asenjo y M. Benito (2007). "Overexpression of SPARC protein contrasts with its transcriptional silencing by aberrant hypermethylation of SPARC CpG-rich region in endometrial carcinoma." *Oncol Rep* 17(6): 1301-7.

Rosen, E. D. y B. M. Spiegelman (2000). "Molecular regulation of adipogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 145-71.

Ruberte E, Marty T, Nellen D, Affolter M, Basler K. (1995). "An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins, for dpp signalling in vivo." *Cell* 80: 889-897.

Sangaletti, S., A. Stoppacciaro, C. Guiducci, M. R. Torrisi y M. P. Colombo (2003). "Leukocyte, rather than tumor-produced SPARC, determines stroma and collagen type IV deposition in mammary carcinoma." *J Exp Med* 198(10): 1475-85.

Sansom, O. J., F. C. Mansergh, M. J. Evans, J. A. Wilkins y A. R. Clarke (2007). "Deficiency of SPARC suppresses intestinal tumorigenesis in APCMin/+ mice." *Gut* 56(10): 1410-4.

Sato, N., N. Fukushima, N. Maehara, H. Matsubayashi, J. Koopmann, G. H. Su, R. H. Hruban y M. Goggins (2003). "SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions." *Oncogene* 22(32): 5021-30.

Schneider, I. (1972). "Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*." *J Embryol Exp Morphol* 27(2): 353-65.

Senoo-Matsuda, N. y L. A. Johnston (2007). "Soluble factors mediate competitive and cooperative interactions between cells expressing different levels of *Drosophila Myc*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47): 18543-8.

Simpson, P. (1979). "Parameters of cell competition in the compartments of the wing disc of *Drosophila*." *Dev Biol* 69(1): 182-93.

Slaughter, D. P., H. W. Southwick y W. Smejkal (1953). "Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin." *Cancer* 6(5): 963-8.

Socha, M. J., N. Said, Y. Dai, J. Kwong, P. Ramalingam, V. Trieu, N. Desai, S. C. Mok y K. Motamed (2009). "Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer." *Neoplasia* 11(2): 126-35.

Sosa, M. S., M. R. Girotti, E. Salvatierra, F. Prada, J. A. de Olmo, S. J. Gallango, J. P. Albar, O. L. Podhajcer y A. S. Llera (2007). "Proteomic analysis identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells." *Proteomics* 7(22): 4123-34.

Soucek, L. y G. I. Evan (2010) "The ups and downs of Myc biology." *Curr Opin Genet Dev* 20(1): 91-5.

Sova, P., Q. Feng, G. Geiss, T. Wood, R. Strauss, V. Rudolf, A. Lieber y N. Kiviat (2006). "Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(1): 114-23.

Suzuki, M., C. Hao, T. Takahashi, H. Shigematsu, N. Shivapurkar, U. G. Sathyanarayana, T. Iizasa, T. Fujisawa, K. Hiroshima y A. F. Gazdar (2005). "Aberrant methylation of SPARC in human lung cancers." *Br J Cancer* 92(5): 942-8.

Tabata, T. (2001). "Genetics of morphogen gradients." *Nat Rev Genet* 2(8): 620-30.

Tabata, T. y Y. Takei (2004). "Morphogens, their identification and regulation." *Development* 131(4): 703-12.

Tamori, Y., C. U. Bialucha, A. G. Tian, M. Kajita, Y. C. Huang, M. Norman, N. Harrison, J. Poulton, K. Ivanovitch, L. Disch, T. Liu, W. M. Deng y Y. Fujita (2010) "Involvement of Lgl and Mahjong/VprBP in cell competition." *PLoS Biol* 8(7): e1000422.

Tartare-Deckert, S., C. Chavey, M. N. Monthouel, N. Gautier y E. Van Obberghen (2001). "The matricellular protein SPARC/osteonectin as a newly identified factor up-regulated in obesity." *J Biol Chem* 276(25): 22231-7.

Teleman, A. y S. Cohen (2000). "Dpp gradient formation in the Drosophila wing imaginal disc." *Cell* 103: 971-980.

Thompson, B. J., J. Mathieu, H. H. Sung, E. Loeser, P. Rorth y S. M. Cohen (2005). "Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in Drosophila." *Dev Cell* 9(5): 711-20.

Tsukazaki, T., T. A. Chiang, A. F. Davison, L. Attisano y J. L. Wrana (1998). "SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor." *Cell* 95(6): 779-91.

Tyler, D. M., W. Li, N. Zhuo, B. Pellock y N. E. Baker (2007). "Genes affecting cell competition in Drosophila." *Genetics* 175(2): 643-57.

Vaccari, T. y D. Bilder (2005). "The Drosophila tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking." *Dev Cell* 9(5): 687-98.

van Oijen, M. G. y P. J. Slootweg (2000). "Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits?" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9(3): 249-56.

Venter, J. C., Adams M. D., y cols. (2001). "The sequence of the human genome." *Science* 291(5507): 1304-51.

Vidal, M. y R. L. Cagan (2006). "Drosophila models for cancer research." *Curr Opin Genet Dev* 16(1): 10-6.

Wang, Y., Q. Yu, A. H. Cho, G. Rondeau, J. Welsh, E. Adamson, D. Mercola y M. McClelland (2005). "Survey of differentially methylated promoters in prostate cancer cell lines." *Neoplasia* 7(8): 748-60.

Wolff, T. y D. F. Ready (1991). "The beginning of pattern formation in the Drosophila compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave." *Development* 113(3): 841-50.

Wolin, K. Y., K. Carson y G. A. Colditz (2010) "Obesity and cancer." *Oncologist* 15(6): 556-65.

Wu, M., J. C. Pastor-Pareja y T. Xu (2010) "Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion." *Nature* 463(7280): 545-8.

Xu, T. y G. M. Rubin (1993). "Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues." *Development* 117: 1223-1237.

Yan, Q., J. I. Clark, T. N. Wight y E. H. Sage (2002). "Alterations in the lens capsule contribute to cataractogenesis in SPARC-null mice." *J Cell Sci* 115(Pt 13): 2747-56.

Yang, E., H. J. Kang, K. H. Koh, H. Rhee, N. K. Kim y H. Kim (2007). "Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers." *Int J Cancer* 121(3): 567-75.

Yao, C. K., Y. Q. Lin, C. V. Ly, T. Ohyama, C. M. Haueter, V. Y. Moiseenkova-Bell, T. G. Wensel y H. J. Bellen (2009). "A synaptic vesicle-associated Ca²⁺ channel promotes endocytosis and couples exocytosis to endocytosis." *Cell* 138(5): 947-60.

Yoo, S. J., J. R. Huh, I. Muro, H. Yu, L. Wang, S. L. Wang, R. M. Feldman, R. J. Clem, H. A. Muller y B. A. Hay (2002). "Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms." *Nat Cell Biol* 4(6): 416-24.

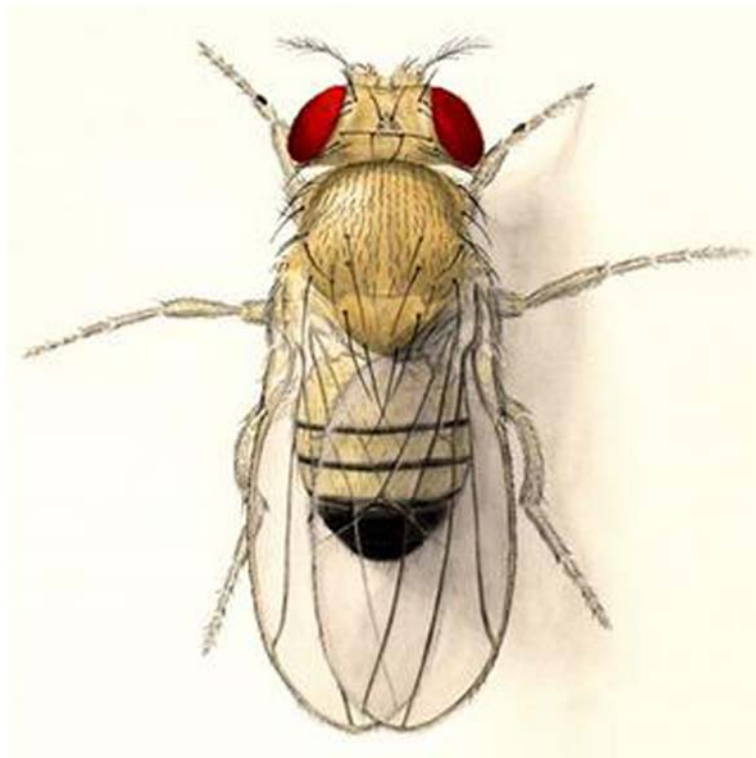
Zecca, M., K. Basler y G. Struhl (1996). "Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient." *Cell* 87(5): 833-44.

Zecca, M. y G. Struhl (2010) "A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to Drosophila wing growth." PLoS Biol 8(6): e1000386.

Zerial, M. y H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat Rev Mol Cell Biol 2(2): 107-17.

Zhao, B., L. Li, Q. Lei y K. L. Guan (2010) "The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version." Genes Dev 24(9): 862-74.

anexo



Manuscript Number: DEVELOPMENTAL-CELL-D-10-00249R2

Title: Drosophila SPARC is a self-protective signal expressed by loser cells during cell competition

Article Type: Research Article

Keywords: dSparc, Drosophila, cell competition

Corresponding Author: Dr. Eduardo moreno,

Corresponding Author's Institution: CNIO

First Author: Marta Portela

Order of Authors: Marta Portela; Sergio Casas-Tinto; Christa Rhiner; Jesus Lopez-Gay; Orlando Dominguez; Davide Soldini; Eduardo moreno

Abstract: During development and ageing, animals suffer insults that modify the fitness of individual cells. In Drosophila, the elimination of viable but suboptimal cells is mediated by cell competition, ensuring that these cells do not accumulate during development. In addition, certain genes such as the Drosophila homologue of human c-myc (dmyc) are able to transform cells into supercompetitors, which eliminate neighbouring wild-type cells by apoptosis and overproliferate leaving total cell numbers unchanged. Here we have identified Drosophila Sparc as an early marker transcriptionally upregulated in loser cells that provides a transient protection by inhibiting caspase activation in outcompeted cells. Overall, we describe the unexpected existence of a physiological mechanism that counteracts cell competition during development.

***Drosophila* SPARC is a self-protective signal expressed by loser cells during cell competition**

Marta Portela^{1*}, Sergio Casas-Tinto^{1*}, Christa Rhiner^{1,4*}, Jesús M. López-Gay¹, Orlando Domínguez², Davide Soldini³ & Eduardo Moreno^{1,4}.

¹*Molecular Oncology Programme. Spanish National Cancer Centre (CNIO), Melchor Fernández Almagro, 3. Madrid, 28034, Spain.*

²*Biotechnology Programme. Spanish National Cancer Centre (CNIO), Melchor Fernández Almagro, 3. Madrid, 28034, Spain.*

³*Institute of Pathology, via in Selva, 24. Locarno, Switzerland.*

⁴*Institute of Cell Biology, University of Bern, Bern, Switzerland.*

**These authors contributed equally to this work*

Summary

During development and ageing, animals suffer insults that modify the fitness of individual cells. In *Drosophila*, the elimination of viable but suboptimal cells is mediated by cell competition, ensuring that these cells do not accumulate during development. In addition, certain genes such as the *Drosophila* homologue of human *c-myc* (*dmyc*) are able to transform cells into supercompetitors, which eliminate neighbouring *wild-type* cells by apoptosis and overproliferate leaving total cell numbers unchanged. Here we have identified *Drosophila* Sparc as an early marker transcriptionally upregulated in loser cells that provides a transient protection by inhibiting caspase activation in outcompeted cells. Overall,

we describe the unexpected existence of a physiological mechanism that counteracts cell competition during development.

Introduction

During their lifetime, cells of multicellular animals can suffer insults (mutations, transient errors, infections, oxidative damage) that may compromise their fitness (Weinberg, 2007). In *Drosophila* there are mechanisms (i.e. “cell competition”) that seem to recognize and eliminate less adapted or weaker cells of developmental primordia, ensuring that viable but suboptimal cells do not accumulate during development or ageing. How groups of cells compare their relative fitness levels and decide which cell will remain in the tissue (“winner cell”) and which cell will die (“loser cell”) is not completely clear. However, recent work in the *Drosophila* imaginal discs has shown that cell competition is a multistep process where at least six steps can be identified:

First, an insult (i.e. mutation in *Minutes* (Morata and Ripoll, 1975; Simpson, 1979; Moreno et al., 2002a) or *dmyc* (Moreno and Basler, 2004; de la Cova et al., 2004)), increases or decreases the fitness of a particular cell within the imaginal disc epithelium. Second, this translates into imbalances in morphogen and survival factor signaling (i.e. differences in signaling levels of the BMP2/4 homolog Decapentaplegic (Dpp)) (Adachi-Yamada et al., 1999; Adachi-Yamada and O'Connor, 2002; Moreno et al., 2002a). Third, different isoforms of the cell membrane protein Flower (Fwe) (Rhiner et al., 2010; Yao et al., 2009) label cells as winners or losers (Rhiner et al., 2010). In *Drosophila*, the *fwe* locus produces three isoforms: Fwe^{ubi}, Fwe^{Lose-A} and Fwe^{Lose-B}. Basal levels of Fwe^{ubi} are constantly produced in the wing imaginal disc, but during cell competition the loser cells downregulate *fwe*^{ubi} and the two *fwe*^{Lose} isoforms are upregulated (Rhiner et al., 2010). Fourth, the expression of *fwe*^{Lose} transcripts ultimately leads to Caspase activation in the “loser” cell (Moreno et al., 2002a; Rhiner et al., 2010). Fifth, weak Caspase activation in the loser cell activates an engulfment response in the winner cell, which is believed to help killing the outcompeted loser cell (Baker and Li, 2008; Li and Baker, 2007) and/or accompanies its extrusion from the epithelial layer (Moreno and Basler, 2004). Finally, this process results in a type of proliferation, where the winner cells

proliferate to replace the loser cells. This type of proliferation requires the killing of the surrounding cells and has been termed “apoptosis-dependent proliferation” (Moreno, 2008).

Certain genes, especially the *Drosophila* homologue of the proto-oncogene *c-myc*, *dmyc*, are able to transform cells into supercompetitors (Moreno and Basler, 2004), which are able to eliminate neighbouring *wild-type* (*wt*) cells by apoptosis. Because the expansion of the supercompetitor cells by “apoptosis-dependent proliferation” occurs at the expense of normal surrounding cells, no morphological defects become apparent since total cell numbers remain unchanged (Moreno and Basler, 2004). Therefore it has been proposed that supercompetition and apoptosis-dependent proliferation could play an important role in early stages of cancer and the formation of “cancerization fields”, which occur in the absence of morphological malformations (Moreno, 2008; Rhiner and Moreno, 2009). It has also been proposed that this function of *d-myc* regulates organ size (de la Cova et al., 2004).

We have identified *dsparc*, the *Drosophila* homologue of the SPARC/Osteonectin protein family (Martinek et al., 2008) as an early marker that is transcriptionally upregulated in loser cells during cell competition. SPARC, a secreted multifunctional glycoprotein, belongs to the family of matricellular proteins, which modulate cell-cell and cell-matrix interactions and are induced during morphogenesis, development, tissue injury and tissue remodeling (Clark and Sage, 2008). Mammalian SPARC is known to bind several ECM proteins and to modulate the activity of various growth factors/chemokines (TGF- β , VEGF etc). It has been mainly found to function in de-adhesion, anti-proliferation and regulation of the ECM production (Framson and Sage, 2004). Studies of tumor growth in SPARC null mice point to a role of SPARC in tumor/stromal cell interactions (Brekken et al., 2003; Sangaletti et al., 2003), but the effects on tumor growth are controversial and poorly understood since SPARC was found to restrict as well as to promote tumor growth and metastasis (Framson and Sage, 2004; Arnold and Brekken, 2009). For example, humans have three different dSparc homologs: SPARC/Osteonectin, SPARC like protein 1 and Follistatin-like protein among which

SPARC/Osteonectin is best studied (Clark and Sage, 2008). SPARC has been clearly implicated in tumor development, but published reports suggest diverse and contradictory functions: SPARC shows differential expression in many epithelial malignancies (prostate, lung, intestine) (Clark and Sage, 2008), and can promote tumour development (Puolakkainen et al., 2004; Sansom et al., 2007), metastasis (Minn et al., 2005) or field cancerization (Brabender et al., 2005), while in other cases SPARC also shows characteristics of a tumor suppressor in many cancers (Brune et al. 2008; Cheetham et al. 2008; Hong et al. 2008; Rodriguez-Jimenez et al. 2007; Sato et al. 2003; Socha et al. 2009; Sova et al. 2006; Suzuki et al. 2005; Wang et al. 2005; Yang et al. 2007). Therefore, how SPARC functions mechanistically in tumorigenesis and metastasis still remains elusive.

Here we describe the existence of a physiological mechanism that counteracts cell competition. We show that transcriptional activation of *dsparc* protects cells against cell-to-cell differences in cellular fitness, setting a higher threshold for Caspase activation in loser cells. This mechanism allows useful cells to recover from transient and limited stress before they are unnecessarily eliminated by their neighbours. Moreover, we show that dSparc also protects *Drosophila* S2 cells from serum withdrawal-induced apoptosis by inhibiting a secreted killing signal. The here described functions of Sparc in *Drosophila* may help to understand the complex behaviour of human and mouse Sparc at tumor-host borders.

Results

We performed gene expression microarray analysis to identify new molecular determinants and markers in the multistep process of cell competition. We compared the transcriptional profile of imaginal discs where cell competition was induced to control samples where no cell competition occurred ((Rhiner et al., 2010); see Materials and Methods). Among the genes that were differentially expressed (Figure S1A) we found CG6378, which encodes for a protein with a signal peptide (Figure S1B) that was transcriptionally upregulated very early during cell competition. CG6378 is the *Drosophila* homolog of mammalian SPARC proteins (Martinek et al., 2008).

dSparc is upregulated during several forms of cell competition and supercompetition

We generated specific antibodies against *Drosophila* Sparc (dSparc) and tested them in several settings where cell competition is known to occur. First, we used the *Minute* (*M*) technique, confronting *M/+* loser cells, heterozygously mutant for a ribosomal protein gene, with *wt* winner cells (Morata and Ripoll, 1975; Simpson, 1979). Imaginal discs formed entirely by *wt* (Figure 1A) or *M/+* cells (Figure 1B) (i.e. in the absence of competition) expressed similar low levels of dSparc. In contrast, clones of *M/+* loser cells growing in the same disc with *wt* cells showed upregulated dSparc (Figure 1C, D). Next, we repeated antibody stainings in a supercompetitor assay: It has been previously shown that cells expressing higher levels of dMyc under the *tubulin* promoter (*tub>dmyc*) can outcompete neighbouring *wt* cells, which in this setting perform as loser cells (Moreno and Basler, 2004; de la Cova et al., 2004). To this end, *wt* cells (*tub>G4*) were generated next to dMyc-overexpressing supercompetitors (*tub>dmyc*) by a heat-shock inducible Flipase that recognizes a *dmyc* cassette flanked by *FRT* sites in *tub>dmycSTOP>G4* transgenic flies. Resulting *wt* cells are marked by GFP by including a *UAS-GFP* transgene that is activated upon Gal4 binding. Again, we first analyzed discs without competition, composed homogenously by *wt* or *tub>dmyc* cells and detected comparable low levels of dSparc (Figure 1E, F). However, in discs where clones of *wt* cells were mixed with *tub>dmyc* cells, dSparc was upregulated in the *wt* loser cells (Figure 1G, H). Then, we used a third setting where cell competition has been described: *lethal-giant-larvae* (*lgl^{-/-}*) clones, like *scribble* or *dlg* mutant cells, behave as loser cells when confronted with *wt* cells (Agrawal et al., 1995; Brumby and Richardson, 2005; Hariharan and Bilder, 2006; Igaki et al., 2006; Cordero et al., 2010). Also in this case, dSparc expression was increased in the loser *lgl^{-/-}* cells (Figure 1I, J). Finally, we tested a fourth competition scenario where *brinker* overexpressing clones behave as loser cells when confronted with *wt* cells in the wing pouch (Moreno et al., 2002a). Once more, dSparc expression was increased in the *brk* overexpressing loser cells (Figure 1K, L). These results suggest that dSparc is upregulated in cells that are subjected to cell competition.

dSparc levels specifically increase upon cell competition

Upregulation of dSparc could be provoked by other cell interactions than competition. To answer this question, we generated *pten* mutant clones as a control, which overproliferate without inducing cell competition (Rhiner et al., 2009) and we observed that cells next to *pten* mutant clones did not show upregulation of dSparc protein (Figure 2A, B). To know whether dSparc is specifically activated by cell competition or may form part of a general response to inducers of apoptosis, we generated clones that overexpress the pro-apoptotic gene *hid* under the control of the *actin* promoter in a *wt* background. Such *hid*-overexpressing clones that are removed by apoptosis (Grether et al., 1995) did not show increased dSparc levels (Figure 2C, D). Next, we used yet a different approach to induce apoptosis in clones in the absence of cell competition. We activated JNK in GFP-marked clones by overexpressing a constitutively active form of *hemipterous* (*hep*) (Glise et al., 1995; Adachi-Yamada et al., 1999), the kinase activating JNK, in a *wt* background. *hep* clones that are eliminated by apoptosis show no upregulation of dSparc protein (Figure 2E). In addition, we generated *eiger* (*egr*)-overexpressing clones in a *wt* background because it is known that *egr* induces cell death independent of cell competition (Igaki et al., 2002; Moreno et al., 2002b). We observed that also in this case there is no upregulation of dSparc in the *egr*-expressing clones undergoing cell death (Figure 2F). Finally, we generated large clones that over-expressed *hid*. To achieve this we used a Gal80^{ts} (McGuire et al., 2003) that at 17°C blocks Gal4 and therefore Hid production. Initially, we let the clones grow for 72 hours at the restrictive temperature (17°C). Afterwards we observed that the large clones disappeared when shifted to the permissive temperature (29°C, that inactivates Gal80^{ts} and allows Hid production) without any upregulation of *dsparc* (Figure 2G-H). These data provide evidence that dSparc is a specific marker of cell competition (Figure 1) and not a general marker of apoptosis (Figure 2).

Early upregulation of dSparc is dependent on Dpp signaling

According to the microarray data, *dsparc* was expressed early on (12 hours after induction of cell competition) and maintained in many cells (in leg,

wing and eye imaginal discs (not shown)). Indeed, abundant *dsparc* transcripts could be detected by mRNA FISH in loser cells 48h after clone induction (ACI), confirming the results of the microarray (Figure 3A, B). To our knowledge, *Drosophila* Sparc is therefore the most reliable marker for cell competition, detectable at transcriptional and translational level (Figures 1 and 3) because, differential expression of downstream components of the Dpp pathway (pMad, Brinker) remains difficult to uncover (Moreno et al., 2002a; Moreno and Basler, 2004) and Caspase activation occurs only in few cells at late stages of the competition process (Moreno et al., 2002a; Li and Baker, 2008).

For epistasis analysis, we checked if Caspase activation is required for dSparc upregulation. For this purpose, we modified the previously described supercompetitor assay by blocking Caspase activation specifically in GFP-marked loser cells either with *UAS-p35* (a baculovirus inhibitor of active caspases (Hay et al., 1994)) or *UAS-dIAP1* (the *Drosophila* inhibitor of apoptosis protein 1, (Yoo et al., 2002)), which are activated by Gal4 after flip-out of the *dmyc* stop cassette. Inhibition of Caspase activity by dIAP1 and p35 had no effect on dSparc induction upon competition 72h ACI (Figure 3C-F) demonstrating that Caspase activation is not required for high dSparc levels in loser cells. This is consistent with the observations that dSparc is an early marker of cell competition detected in all outcompeted cells, whereas Caspase activation is a late event detected only in a few cells at a given time.

Next, we studied how dSparc expression in the supercompetitor assay is affected by manipulations of upstream events of cell competition such as imbalances in morphogen and survival factor signalling. Since loser *wt* cells have a deficit in survival signalling compared to dMyc-overexpressing supercompetitors (Moreno et al., 2002a; Moreno and Basler, 2004), we overexpressed several survival factors and/or morphogens, including Dpp, Wingless and the Insulin-receptor specifically in loser cells. Consistent with previous results, *UAS-Dpp* overexpression significantly rescued the elimination of *wt* loser cells (Moreno and Basler, 2004) and repressed dSparc activation (Figure 3G, H). In contrast, *wt* loser cells overexpressing Wingless and Insulin-receptor driven by *UAS* still showed high levels of dSparc protein (Figure 3I-L).

Since cell competition can trigger JNK activation in the loser cells (Moreno et al., 2002a) we also tested if dSparc upregulation depends on the activation of the JNK pathway. We blocked JNK activity specifically in the loser cells using the JNK phosphatase *puckered (puc)* (Martín-Blanco et al., 1998) or a dominant negative form of the *Drosophila* JNK Basket (Glise and Noselli, 1997) specifically in loser cells with UAS transgenes (Figure 3 M-P). Inactivation of the JNK pathway did not repress dSparc upregulation despite it rescued cell death as previously shown (Moreno et al., 2002a; Moreno and Basler, 2004).

From the above experiments we conclude that dSparc acts downstream of Dpp and that the enhancement of dSparc expression during cell competition occurs independent of JNK signalling.

dSparc protects loser cells during cell competition

To functionally analyze the role of dSparc, we decided to use specific *dsparc* RNAi lines (Dietzl et al, 2007), which permits to study the reduction of the extra dSparc produced by the loser cells (Figure S2A-C). The three RNAi lines used (from two different collections, KK and GD), have one possible off-target by sequence homology, *CG11874*, which is a gene of unknown function. We found that *CG11874* is expressed in the imaginal discs but its expression is not affected by *dsparc* RNAi suggesting that the RNAi lines only target *dsparc* (Figure S2D-F). When *UAS-RNAi dsparc* was activated in loser cells in the supercompetitor assay, the majority of those cells were eliminated and the clones were strongly reduced in size at 48 hours ACI, whereas loser cells with intact *dsparc* levels showed this effect only at 72h ACI (Figure 4A-D, G). Activation of *UAS-RNAi dsparc* in control clones (using *tub>CD2>Gal4* or *actin1>yellow>Gal4* flies) did not affect survival of the *dsparc* RNAied cells surrounded by *wt* cells (no RNAi) (Figure 4D'). We obtained similar data for all 3 *dsparc* RNAi lines of the KK and GD collection (Figure S2 G-O). In addition, when we generated GFP-marked wt loser cells in a *tub>dmyc* background but in a disc heterozygously mutant for a deletion in *dsparc* (*Df(3R)nm136* (Martinek et al., 2008)), *wt* clones were outcompeted faster compared to the control (Figure S2G-M) similar to the *dsparc* RNAi data. This raised the possibility that dSparc extra-production could be actively protecting loser cells

during cell competition. Alternatively, the faster elimination of *dsparc* RNAi-ed loser clones could be merely due to a cell-autonomous additive effect (i.e. reducing dSparc in already weakened cells due to cell competition).

To further investigate whether dSparc in loser cells could serve as a protective signal, which partially delays the elimination of outcompeted cells, we decided to overexpress *dsparc* in loser cells by generating an untagged and a C-terminally HA-tagged *UAS-dsparc* construct (Figure S2P-S). Experiments with such transgenic flies should reveal whether dSparc overexpression is sufficient to protect loser cells from being outcompeted in a dose-dependent manner. When *UAS-dsparc* or *UAS-dsparc-HA* were activated specifically in the loser *wt* cells surrounded by *tub>dmyc* supercompetitors, apoptosis was reduced and cell competition prevented (Figure 4E-G). Overexpression of *dsparc* rescued cell elimination even better than overexpression of p35 (Figure 4G). This is a stringent assay, because few factors are able to rescue the elimination of loser cells during cell competition. Based on these results, we conclude that dSparc is sufficient to act as a protective signal in loser cells.

At which level of the multistep process of cell competition is dSparc acting as a protective signal? dSparc overexpression or RNAi did neither affect dMyc expression nor Dpp signalling (pMad) (Figure S2T-W). Furthermore, dSparc-overexpressing cells that were confronted with *tub>dmyc* supercompetitors, survived and did not show any signs of Caspase activation, whereas p35 overexpression blocks cell death but does not prevent Caspase activation (Figure 4J, K, compare it with Figure 4H, I), proving that high levels of dSparc are not only necessary but sufficient to interrupt the process before Caspase activation, and therefore upstream engulfment (Li and Baker, 2007) and/or basal extrusion (Moreno and Basler, 2004). These epistasis experiments suggest that dSparc acts downstream of survival factor withdrawal, but upstream of Caspase activation.

dSparc does not generally protect from apoptosis

To test whether dSparc could function as an inhibitor of apoptosis in other contexts, we coexpressed *egr* and *dsparc* under the control of the eye-specific *gmr* promoter (Figure 5A,B), which triggers apoptosis in cells posterior to the

morphogenetic furrow (Igaki et al., 2002; Moreno et al., 2002b). We compared the eye size of these flies with flies that only express *egr* (Figure 5A), with flies that coexpress *egr* and dIAP1 (Figure 5C) and flies that coexpress *egr* and the *egr RNAi* (Figure 5D) (that have a *wt* eye) and we observed that *dSparc* is not able to block or suppress the eye elimination phenotype induced by *egr* (Figure 5A-E). Because most of the assays that we used to investigate dSparc's ability to inhibit cell death were performed in scenarios of catastrophic cell death induced by overexpression of proapoptotic factors, we decided to examine the effect of dSparc overexpression in more physiological cell death scenarios such as developmental apoptosis involved in the terminalia rotation of *Drosophila* males. The terminalia is composed of two fused segments, the genitalia (Estrada and Sánchez-Herrero, 2000) and the analia (Moreno and Morata, 1999) that rotate together. It has been shown that terminalia rotation requires cell death and that it can be blocked by inhibition or reduction of apoptosis, for example using the caspase inhibitor p35 (Figure 5F-H) (Macias et al., 2004) or mutants for the pro-apoptotic factor *hid* (Abbott and Lengyel, 1991; Macias et al., 2004). We observed that, unlike general inhibitors of developmental apoptosis, the overexpression of *dSparc* in the genital disc using the *en-gal4* driver gives rise to a *wt* terminalia (Figure 5F-H) showing that it does not block this apoptosis-dependent developmental process. We also checked the random apoptosis in wing imaginal discs. *ap-gal4/+* imaginal discs show random apoptosis in the wing pouch that is higher in the dorsal region of the developing wing (Figure 5I,L), but that does not seem to affect the morphology of the adult, because those wings are morphologically normal (Calleja et al., 1996). Overexpression of dIAP1 was able to block this apoptosis (Figure 5J,M) but dSparc was not (Figure 5K,N). These data, together with the fact that dSparc does not prevent X-ray induced Caspase activation (Figure S3), suggest that dSparc is not a general inhibitor of apoptosis, despite its potent inhibition of cell competition-induced cell death (Figure 4).

dSparc protein protects S2 cells from a “killing signal” (KS)

We next sought to uncover how upregulated dSparc works to buffer survival factor deficits in outcompeted cells. First, we tested if dSparc-HA is

secreted in *Drosophila* (S2) cells. Expression of HA-tagged dSparc resulted in presence of the protein in both cellular and supernatant extracts, confirming the functionality of the secretion signal (Figure 6A). To evaluate a protective role of dSparc after survival factor withdrawal, S2 cells were transiently transfected with either *dsparc* or *GFP* and, after 48 hours, serum was removed from the medium; cell survival and apoptosis were measured 24 hours later. After serum deprivation only 40% of the cells expressing GFP survived (Figure 6B, C, G), whereas 95% of the cells in the well transfected with *dsparc* survived after the same treatment (Figure 6D, G).

Since dSparc is secreted into the medium, we tested whether the presence of dSparc protein in the supernatant could confer some protection to *wt* S2 cells after serum deprivation. The addition of conditioned, serum-free medium from dSparc-transfected cells resulted in a significant protection of serum-deprived *wt* cells (Figure 6E, G); this protection was reverted when anti-dSparc antibody was added to such medium (Figure 6F, G). Similar to outcompeted cells in the imaginal discs, S2 cells upregulated dSparc upon serum deprivation as detected by increased signal in immunohistochemistry (Figure 6H-I). Western Blot analysis performed with S2 cell lysates before and after serum withdrawal confirmed that dSparc protein levels rise markedly following serum withdrawal (Figure 6J). These results suggest a protective effect for the secreted form of dSparc.

In order to find out the mechanism of action of dSparc, S2 cells were serum-deprived for 24 hours and when they started to die the conditioned supernatant of these cells was collected (killing signal-medium or KS-medium). When added to healthy S2 cells, the KS-medium induced cell death in the absence of serum deprivation (Figure 6K), suggesting that at least one secreted killing signal (KS) is present. To test whether secreted dSparc can inactivate the KS, we combined the KS-medium with the supernatant of cells transfected with the *dsparc* plasmid and the reversion of the KS-effect was indeed observed (Figure 6L). Importantly, even when the same KS medium was added to healthy S2 cells, together with purified dSparc protein, cell survival increased (Figure 6M). All these findings indicate that the KS is a secreted molecule.

dSparc and Fwe belong to different pathways in cell competition

Next we wanted to test whether there is any relationship between dSparc and Fwe since both have specific functions during cell competition (Rhiner et al., 2010), and could be part of the same pathway.

First we used the supercompetitor assay and expressed *fwe RNAi* in *wt* loser cells (green) in a *tub>dmyc* background; we observed that knock-down of all the Fwe isoforms did not interfere with dSparc upregulation in loser cells during cell competition (Figure 7A-B). Next, we overexpressed *dsparc*, in addition to the upregulation of the endogenous dSparc, in GFP-marked *wt* loser cells in a *dmyc*-overexpressing background and performed in-situ hybridization with *fwe^{Lose-A}* mRNA probe. We found that *fwe^{Lose-A}* upregulation is not affected by additional overexpression of dSparc during cell competition (Figure 7C-F). Because it is known that the overexpression of *fwe^{Lose}* isoforms induces apoptosis (Rhiner et al., 2010), we generated *wt* clones that overexpress UAS-*fwe^{Lose-A}* or UAS-*fwe^{Lose-B}* in a *wt* background, where no competition takes place (Figure 7G-J). We observed that the endogenous levels of dSparc did not change in the entire disc, and there was also no upregulation of dSparc in the *fwe^{Lose}* overexpressing clones. Finally, we generated *fwe* mutant clones that are eliminated due to the lack of *fwe^{ubi}* (Rhiner et al., 2010) and could not detect any altered dSparc expression in such clones (Figure 7K-M). These results suggest that dSparc and Fwe functions in parallel pathways and have opposing roles during cell competition (Figure 7N).

Discussion

In summary, we describe here the existence of a physiological mechanism that counteracts cell competition. We provide evidence that dSparc is a specific marker of cell competition and not a general marker of apoptosis. Transcriptional activation of *dsparc* sets a higher threshold for Caspase activation in loser cells, possibly by inactivating an unknown secreted killing signal, which is produced upon survival factor withdrawal. We further show that dSparc is not a general inhibitor of apoptosis, despite its potent inhibition of cell competition-induced cell death. dSparc may allow useful cells to recover from transient and limited damage before they are unnecessarily eliminated by their

neighbours. Our results show that dSparc and Fwe function in parallel and opposing pathways during cell competition, with dSparc providing transient protection while the “Fwe Code” promotes cell elimination by labelling cells as “losers” (Rhiner et al., 2010). Therefore it seems likely that during early stages of cell competition, the decision of whether the potential loser cell will finally undergo apoptosis or not is still reversible. This intermediate state, where dSparc protects outcompeted cells, may prevent the removal of valid cells that suffer only a temporary fitness deficit. However, if the differences in cellular fitness persist and/or are too ample, cell competition-induced apoptosis is nevertheless triggered.

One possibility is that secreted dSparc blocks the unknown killing signal/s (KS) directly in the extracellular space. dSparc could bind directly to the KS(s) or just form a matrix that serves as a barrier for the KS(s) to reach the loser cells. The other possibility is that dSparc could activate a protective pathway in an autocrine way that counteracts the effects of the KS. For example, mammalian SPARC has been shown to protect cells from apoptosis *in vitro* via activation of integrin-linked kinase and AKT (Weaver et al. 2008; Shi et al., 2004). Whether the KS(s) is/are the same as the one proposed previously (Senoo-Matsuda and Johnston, 2007) is unclear, because unfortunately we were unable to reproduce their results in our laboratory (Casas-Tinto and Moreno, unpublished).

We describe a physiological process that counteracts cell competition and that relates dSparc to cell competition. If cell competition is conserved in mammals, as mounting evidence suggest (Bondar and Medzhitov, 2010; Oertel et al., 2006; Oliver et al., 2004; Sansom et al., 2007; Tamori et al., 2010), this role of dSparc specifically repressing cell competition may have important consequences for our understanding of mammalian development, homeostasis, stem cell replacement or cancer. In particular, deregulation of this mechanism is likely to be important in cancer (Moreno, 2008; Vidal and Cagan, 2006; Tamori et al., 2010; Bondar and Medzhitov, 2010), for example by allowing metastatic cells to survive in a new environment or during the expansion of cancerization fields.

Materials and Methods

In-situ hybridization

To determine whether *CG6378* (*dsparc*) was expressed in loser or winner cells, mRNA FISH was performed as previously reported (Rhiner et al., 2010). Probes were generated using the following primers:

CG6378 SP6:

5'ATTAGGTGACACTATAGAAGAGTCTGCACCAATACCAACGAG 3'

CG6378 T7:

5'TAATACGACTCACTATAGGGAGACGATGGTCCTTGTTGGAGTC 3'

Primers to generate the probe to detect *fwe*^{Lose-A} expression were the following:

fwe^{Lose-A} SP6:

5'ATTAGGTGACACTATAGAAGAGGCTTCTCGAGAGGACATGG 3'

fwe^{Lose-A} T7:

5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCGCCAGACATCGG 3'

Cell culture and transactivation assays

The plasmid *actα1>Gal4* (gift of K. Basler) was used in the transfections to activate the *UAS* constructs. *dsparc* cDNAs was cloned into KpnI and XbaI restriction sites of *pUASp* in frame with a C-terminal HA epitope or without tag, yielding the expression construct *pUAS-dsparc-HA* and *pUAS-dsparc*. The *pUAS-GFP* vector was used as control. 1.5×10^6 S2 cells were transfected with SuperFect (QIAGEN) using 0.2μg DNA from each construct. Cells were treated with PBS/NaCl 150mM/ Triton 1% buffer to extract proteins.

For serum deprivation and killing signal (KS) experiments, cells were cultured in Schneider's medium (Sigma) 10% serum fetal bovine and antibiotics (penicillin and streptomycin) in 75cm³ flasks for 24 hours. Medium was substituted with serum free medium (Grace's insect media (Lonza)) and cells were maintained for further 24 hours. Then, supernatant was recovered and complemented with 10% serum, which was termed KS-medium.

For immunostaining, transfected cells were fixed and then stained with mouse anti-dSparc (1: 10) or rat anti-HA antibody (1:500) (Roche), phalloidin Alexa fluor 488 (Invitrogen), and fluorescence-coupled secondary antibodies (1:250;

Invitrogen). Cells were mounted in Vectashield with DAPI.

For Western blots, we used NuPAGE Bis-Tris Gels 4-12% (Invitrogen), and the following primary antibodies: rat anti-HA antibody (1:5000) (Roche), mouse anti-tubulin (1:1000000) (Sigma) and rabbit anti-dSparc antibody (1:5000) (a gift from Martinek N).

wt clones in tub>dmyc background expressing effector transgenes and mitotic recombination clones

The fly stocks used were obtained from the Bloomington Stock Center except where indicated. To generate *wt* clones in *tub>dmyc* background expressing different *UAS* constructs, crosses were performed as previously described (Moreno and Basler 2004). The following stocks were used: *UAS-p35*, *UAS-dIAP1*, *UAS-Dpp*, *UAS-LacZ*, *UAS-wg-HA*, *UAS-InR*, *UAS-puc*, *UAS-RNAi egr*, *UAS-bsk^{DN}* and *w;H2Av-GFP Df(3R)nm136* (Martinek et al, 2008). The larvae were subjected to a 15-min heat shock at 37°C and harvested 48 and 72h ACl.

For RNAi experiments the following stocks of the VRDC center were used: *UAS-RNAi dsparc* (ID 16677, Chr 2, viable), *UAS-RNAi dsparc* (ID 16678, Chr 3, viable), and *UAS-RNAi dsparc* (ID 100566, Chr 2, viable), *UAS-RNAi fwe* (ID 39596, Chr 2, viable), *UAS-RNAi fwe* (ID 104993, Chr 2, viable), *UAS-RNAi egr* (ID 45253, Chr 3, viable). Multiple *UAS-dsparc* and *UAS-dsparc-HA* transgenic lines for overexpression experiments were generated by standard methods. For the generation of mitotic recombination clones the following stocks were used: *ywhs-FLP; FRT82B arm-lacZ/TM6b*, *ywhs-FLP; FRT82B ubi-GFP M (3L)RpS3*, *ywhsf*, *tub-gal4 UAS-GFP/FM7*; *ubigal80FRT40/CyO*, *Igf⁴ FRT40/ CyO*, *ywhsf; FRT40 ubi-GFP/CyO*, *PTEN¹⁰⁰ FRT40/CyO* males, *ywf;Sp/CyO*; *ubi-GFP FRT80B/TM6b*, *fwe²⁰² FRT80B/TM6b*. To generate *wt* clones in a *wt* background the following stocks were used: *ywf; sp/CyO*; *Pact>y>gal4 UAS-GFP/TM6b* (a gift of R. Mann), *UAS-brk*, *UAS-hep^{CA}*, *w;UAS-HA-egr* (M. Miura), *UAS-fwe^{Lose-A}* and *UAS-fwe^{Lose-B}*, *UAS-hid* (H. Steller), *ywf*, *Pact>CD2>gal4 UAS-GFP*; *gal80^{ts}/TM6b*. For the eye phenotype the following stocks were used: *gmr-Gal4 UAS-egr/CyO*, *UAS-LacZ*, *UAS-dsparc*, *UAS-dIAP1*, *UAS-RNAi egr II*.

For the terminalia study the following stocks were used: *en-Gal4 II*, *UAS-lacZ*, *UAS-dsparc*, *UAS-p35*.

The following driver lines were used in this study: *ap-Gal4 UAS-GFP/CyO*, *en-Gal4 UAS-GFP/CyO*, *da-Gal4* and *gmr-Gal4 UAS-egr/CyO*.

Quantifications

The areas occupied by GFP positive clones and the wing pouch areas were quantified in all the discs using Metamorph 7.0 (Molecular Devices). Averages and the standard deviation (SD) were calculated for each timepoint (24, 48 and 72h). All error bars represent SD. Statistical significance was calculated with the Student's T-test.

The eye area was quantified using Image-J A 1.44a software.

Apoptotic corpses in discs containing dSparc-overexpressing clones in a dMyc-overexpressing background were counted by Metamorph 7.0 (Molecular Devices).

dSparc antibody and immunohistochemistry

A mouse monoclonal antibody against the peptide EAETNNSRRWSNAAVWKWC of dSparc was generated by standard methods. Imaginal discs were fixed and incubated with anti-dSparc (1:10) followed by signal amplification with tyramide (Invitrogen). Further antibodies used for immunohistochemistry were :rabbit anti-GFP (1:250) (Invitrogen), mouse anti-GFP (1:250) (Roche), rabbit anti-pMad (1:400) (G. Morata), mouse anti-dMyc (R.N. Eisenman and B.A. Edgar), rabbit anti-cleaved Caspase-3 (Cell Signaling Technology), rat anti-HA (Roche), mouse anti-Wg (DSHB). All images were obtained with a LEICA TCS-SP2-AOBS.

Acknowledgements

We thank K. Basler, P. Geuking, G. Hausmann, F. Lolo, N. Martinek, A. Pérez-Garijo, the Bloomington and Vienna VDRC stock centres for materials. F. A. Martín for critically reading the manuscript. S.C. is supported by the “Juan de la Cierva” program from the MICINN. Work in our laboratory is funded by the European Research Council, Caja Madrid, Mutua Madrileña Science Foundation, Swiss National Science Foundation, and the autonomous community of Madrid. The authors declare no competing interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.S. (dsoldini@gmx.ch) or E.M. (emoreno@cniio.es).

Figure legends

Figure 1: Loser cells upregulate dSparc during cell competition.

(A) *Wt* and (B) Minute heterozygous (*M/+*) control wing discs stained with anti-dSparc (red), showing uniform expression. Inset in B shows a wing disc heterozygous for the *Minute* mutation marked by GFP (*M,ubi-gfp*). (C-D) *M*⁺ (*wt*) clones in a *M/+* background. dSparc (red) is up-regulated in *M/+* cells (green). (E-F) Control discs showing endogenous expression of dSparc (red) both in *wt* (E) and *tub>dmyc* (F) wing epithelia. (G-H) *wt* clones (green) in a *tub>dmyc* background upregulate dSparc (red). (I-J) *lgl* mutant clones (green) show increased dSparc expression (red). The clone boundaries are outlined in white colour. (K-L) *brk* overexpressing clones (green) in a *wt* background show upregulation of dSparc (red). Inset in K-L (K'-L') show a magnification of the *UAS-brk* clones.

Figure 2: dSparc is a specific marker of cell competition

(A-B) GFP-marked cells next to *pten* mutant clones (absence of green) do not show dSparc upregulation (red). (C-D) *hid*-overexpressing clones (green) in a *wt* background do not present enhanced dSparc expression (red). Insets in C' and D' show a magnification of dSparc staining and GFP clones (arrows). (E) *hep*^{CA} overexpressing clones (green) in a *wt* background do not show upregulation of dSparc (red). (E') Nuclei are stained with DAPI (blue). (E'') dSparc staining is shown in red. (E''') merge. (F) *egr*-overexpressing clones (green) in a *wt* background do not show increased dSparc levels (red). (F') anti-HA staining to

visualize HA-egr expressing clones in magenta. (F'') dSparc staining (red). (F''') merge (There are white arrows pointing to the small GFP clones). (G-H) *hid*-overexpressing clones (green) during 24h under the control of Gal 80^{ts} in a *wt* background do not show upregulation of dSparc (red).

Figure 3: Epistasis analysis.

(A-B) *In-situ* hybridization reveals the presence of *dsparc* mRNA (red) in *wt* clones (green) in a *tub>dmyc* background. (C-F) Neither expression of *p35* (C) nor *dIAP1* (E) can downregulate dSparc expression (red) in loser cells, even though they are rescued from cell competition (72h after clone induction (ACI)). Quantitation of dSparc levels in loser cells did not show significant differences between the experiments shown in Figure 1G-H and those from Figure 3C-F (not shown). (G-H) The overexpression of *Dpp* specifically in loser cells prevents dSparc upregulation (G), whereas overexpression of *InR* (I-J) or *Wg* (K-L) do not (48h ACI). Expression of *UASpuc* (M,N) or a dominant negative form of *bsk* (*UASbsk^{DN}*) (O,P) in loser cells (green) does not suppress dSparc upregulation (red), even though loser cells are rescued from cell competition (72h ACI).

Figure 4: Overexpression of dSparc rescues *wt* cells from cell competition.

(A) GFP-marked *wt* cells (green) in a *tub>dmyc* supercompetitor background 48h and (B) 72h ACI. *wt* loser cells are gradually outcompeted, first in the wing pouch until only a few clones remain in the periphery of the disc. (C) RNAi of *dsparc^{GD}* (Chr 3) specifically expressed in loser cells marked by GFP, leads to a faster reduction of loser clones (green) at 48h and (D) 72h ACI compared to *wt* cells (A and B, respectively). (D') control *wt* clones expressing RNAi of *dsparc* (green). (E) Overexpression of *dsparc* specifically expressed in the losers which are marked by GFP (using a *UAS-dsparc* transgene) rescues the elimination of loser clones (green) by *tub>dmyc* supercompetitors at 48 h ACI (E) and 72 h ACI (F). (G) Quantification of remaining loser clones in the supercompetitor assay at various timepoints ACI, the number of animals analyzed is indicated (n). Error bars represent standard deviation (SD). The

asterisks indicate statistical significance in a Student's T-Test. (H) Loser clones (green) in a *tub>dmyc* background 72h ACI expressing a *UAS-p35* transgene. (I) Caspase-3 staining is shown in red. (J) Loser clones (green) in a *tub>dmyc* background expressing *UAS-dsparc* at 72h ACI; In this case, Caspase 3 activation is prevented. Note the absence of red apoptotic cells (K).

Figure 5: dSparc is not a general inhibitor of apoptosis.

(A-E) *egr* is ectopically expressed in the eye under the *gmr* promoter where it induces cell death and causes eye ablation (A). Coexpression of *egr* and *dsparc* does not block or suppress the eye elimination phenotype (B). Coexpression of *egr* and *dlAP1* partially suppresses the eye elimination phenotype (C). Coexpression of *egr* and the *egr RNAi* rescues the eye elimination phenotype (D). (E) Quantification of the eye area for all genotypes, the number of animals analyzed is indicated (n). Error bars represent SD. The asterisk indicate statistical significance $p < 0,0001$ in a Student's T-Test (n.s.= not significant). (F) wt male with its ventral side up, showing the correct position of external terminalia (analia plus genitalia). The positions of the genitalia and analia are indicated. (G) If developmental cell death is inhibited in the male terminalia (in *en-Gal4; UASp35* flies) the flies show a failure in the rotation of the analia and genitalia compared to the wild-type. (H) Males overexpressing dSparc in the terminalia (*en-Gal4; UASdsparc*) show a normal arrangement of the terminalia. (I-N) *lacZ* as a control, *dlAP1* and *dsparc* are ectopically expressed in the dorsal compartment of the wing pouch driven by *ap>Gal4* (green). Active Caspase 3 is shown in red. Apoptosis is inhibited by *dlAP1* (compare I,L with J, M). The Caspase 3 activation in discs with dorsal *dsparc* overexpression (K, N) is similar to a wt disc (I, L).

Figure 6: dSparc protein protects S2 cells from a “Killing Signal”

(A) Western blot with proteins from dSparc-HA transfected S2 cells and respective supernatants. dSparc-HA protein can be detected with an anti-HA antibody (red band, arrowhead). Tubulin (green) is used as a loading control. Protein complexes including dSparc-HA are found in the supernatant fractions (red band, arrow). (B-F) (B) S2 cells grown in presence of 10% serum, (C) in

serum-free media, (D) transfected with dSparc-HA and serum deprived, (E) serum deprived S2 cells complemented with dSparc enriched supernatant (from 6D), (F) same as (E) plus specific anti-dSparc antibody. (G) Cell survival is plotted after different treatments: Serum or Killing Signal (KS). Tf, transfected. Sp, supernatant. Ab, dSparc antibody. Error bands represent SD, N=3. (H-I) Endogenous dSparc expression in S2 cell cultivated in 10% serum (H) or under serum deprivation (I). (J) Western blot with proteins from S2 cells cultivated in 10% serum or under serum deprivation, endogenous dSparc protein is upregulated in serum-deprived conditions. dSparc protein was detected with anti-dSparc antibody and Tubulin is used as a loading control. (K-M), (K) S2 cells after 36 hours in KS-enriched medium (supernatant from 6C + 10% serum, see methods). (L) KS-enriched medium supplemented with dSparc supernatant (from fig 6D). (M), KS-enriched medium supplemented with 150 ng/100 μ l of dSparc purified protein. The S2 cells in B-F and K-M are stained with phalloidin (green) to visualize the cell shape and DAPI (blue) to mark the nuclei.

Figure 7: dSparc and Fwe belong to different pathways in cell competition

(A-B) Expression of *fwe* RNAi specifically in GFP-marked *wt* cells (green) surrounded by *tub>dmyc* supercompetitors. The downregulation of *fwe* does not interfere with the upregulation of dSparc upon supercompetition (red). (C-D) In-situ hybridization reveals the presence of *fwe*^{Lose-A} mRNA (red) in *wt* clones that ectopically overexpress *dsparc* (green) in a *tub>dmyc* background. Negative control with *fwe*^{LoseA} sense probe for the in-situ hybridization (E-F). (G-H) *wt* clones that overexpress *fwe*^{Lose-A} are marked with GFP (green) in a *wt* background do not show changes in dSparc levels (red). (I-J) *wt* clones overexpressing *fwe*^{Lose-B} (green) in a *wt* background do not show changes in dSparc expression (red). (K-M) *fwe* mutant clones (absence of green) do not show altered dSparc expression (red). (N) *dsparc* and *fwe* both play a role during cell competition in the loser cells but they act in independent pathways (SF means survival factors).

References

- Abbott, M.K., and Lengyel, J.A. (1991). Embryonic head involution and rotation of male terminalia require the *Drosophila* locus head involution defective. *Genetics* 129, 783-789.
- Adachi-Yamada, T., and O'Connor, M.B. (2002). Morphogenetic apoptosis: a mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients. *Dev Biol* 251, 74-90.
- Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y., and Matsumoto, K. (1999). Distorsion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* 400, 166-169.
- Agrawal, N., Kango, M., Mishra, A., and Sinha, P. (1995). Neoplastic transformation and aberrant cell-cell interactions in genetic mosaics of lethal(2)giant larvae (lgl), a tumor suppressor gene of *Drosophila*. *Dev Biol* 172, 218-229.
- Arnold SA, Brekken RA (2009). SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *J Cell Commun Signal.* 3(3-4):255-73.
- Baker, N.E., and Li, W. (2008). Cell competition and its possible relation to cancer. *Cancer Res* 68, 5505-5507.
- Bondar, T., and Medzhitov, R. p53-mediated hematopoietic stem and progenitor cell competition. *Cell Stem Cell* 6, 309-322.
- Brabender, J., Marjoram, P., Lord, R.V., Metzger, R., Salonga, D., Vallbohmer, D., Schafer, H., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Selaru, F.M., et al. (2005). The molecular signature of normal squamous esophageal epithelium identifies the presence of a field effect and can discriminate between patients with Barrett's esophagus and patients with Barrett's-associated adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 2113-2117.
- Brekken, R.A., Puolakkainen, P., Graves, D.C., Workman, G., Lubkin, S.R., and Sage, E.H. (2003). Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest* 111, 487-495.
- Brumby, A.M., and Richardson, H.E. (2005). Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways. *Nat Rev Cancer* 5, 626-639.
- Brune K, Hong SM, Li A, Yachida S, Abe T, Griffith M et al (2008) Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:3536–3542
- Calleja M, Moreno E, Pelaz S, Morata G. Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science*. 1996 Oct 11;274(5285):252-5.

Cheetham S, Tang MJ, Mesak F, Kennecke H, Owen D, Tai IT (2008) SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'deoxyctidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *Br J Cancer* 98:1810–1819

Clark, C.J., and Sage, E.H. (2008). A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment--where there's SPARC, there's fire. *J Cell Biochem* 104, 721-732.

Cordero, J.B., Macagno, J.P., Stefanatos, R.K., Strathdee, K.E., Cagan, R.L., and Vidal, M (2010). Oncogenic Ras diverts a host TNF tumor suppressor activity into tumor promoter. *Dev Cell* 18, 999-1011.

De la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P., and Johnston, L.A. (2004). *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* 117, 107-116.

Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S., et al. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448, 151-156.

Estrada B, Sánchez-Herrero E. (2001). The Hox gene Abdominal-B antagonizes appendage development in the genital disc of *Drosophila*. *Development*. 128, 331-339.

Framson, P.E., and Sage, E.H. (2004). SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *J Cell Biochem* 92, 679-690.

Glise, B. and Noselli, S. (1997). Coupling the Jun amini-terminal kinase and decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Genes and Development* 11, 1738-1747.

Glise B, Bourbon H, Noselli S (1995). hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* 83(3):451-61.

Grether, M.E., Abrams, J.M., Agapite, J., White, K., and Steller, H. (1995). The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev* 9, 1694-1708.

Hariharan, I.K., and Bilder, D. (2006). Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 40, 335-361.

Hay, B.A., Wolff, T., and Rubin, G.M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* 120, 2121-2129.

Hong SM, Kelly D, Griffith M, Omura N, Li A, Li CP et al (2008) Multiple genes are hypermethylated in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* 21:1499–1507

Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., and Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J* 21, 3009-3018.

Igaki T, Pastor-Pareja JC, Aonuma H, Miura M, Xu T (2009). Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in *Drosophila*. *Dev Cell*. 16(3):458-65.

Li, W., and Baker, N.E. (2007). Engulfment is required for cell competition. *Cell* 129, 1215-1225.

Macias, A., Romero, N.M., Martin, F., Suarez, L., Rosa, A.L., and Morata, G. (2004). PVF1/PVR signaling and apoptosis promotes the rotation and dorsal closure of the *Drosophila* male terminalia. *Int J Dev Biol* 48, 1087-1094.

Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A.M., and Martinez, A.A. (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* 12, 557-570.

Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M., and Ringuette, M. (2008). Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* 121, 1671-1680.

McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., and Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302, 1765-1768.

Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., Viale, A., Olshen, A.B., Gerald, W.L., and Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518-524.

Morata, G., and Ripoll, P. (1975). Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol* 42, 211-221.

Moreno, E. (2008). Is cell competition relevant to cancer? *Nat Rev Cancer* 8, 141-147.

Moreno, E., and Basler, K. (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* 117, 117-129.

Moreno, E., Basler, K., and Morata, G. (2002a). Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* 416, 755-759.

Moreno E and Morata G. (1999). Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior *Drosophila* segment. *Nature* 400, 873-877.

Moreno, E., Yan, M., and Basler, K. (2002b). Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr Biol* 12, 1263-1268.

Oertel, M., Menthena, A., Dabeva, M.D., and Shafritz, D.A. (2006). Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 130, 507-520; quiz 590.

Oliver, E.R., Saunders, T.L., Tarle, S.A., and Glaser, T. (2004). Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development* 131, 3907-3920.

Puolakkainen, P.A., Brekken, R.A., Muneer, S., and Sage, E.H. (2004). Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis. *Mol Cancer Res* 2, 215-224.

Rhiner, C., Lopez-Gay, J.M., Soldini, D., Casas-Tintó, S., Martín, F.A., Moreno, E. (2010). Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in *Drosophila*. *Dev Cell*. 18, 882-3.

Rhiner, C., and Moreno, E. (2009). Super competition as a possible mechanism to pioneer precancerous fields. *Carcinogenesis* 30, 723-728.

Rhiner, C., Diaz, B., Portela, M., Poyatos, J.F., Fernandez-Ruiz, I., Lopez-Gay, J.M., Gerlitz, O., and Moreno, E. (2009). Persistent competition among stem cells and their daughters in the *Drosophila* ovary germline niche. *Development* 136, 995-1006.

Rodriguez-Jimenez FJ, Caldes T, Iniesta P, Vidart JA, Garcia-Asenjo JL, Benito M (2007) Overexpression of SPARC protein contrasts with its transcriptional silencing by aberrant hypermethylation of SPARC CpG-rich region in endometrial carcinoma. *Oncol Rep* 17:1301–1307

Sangaletti, S., Stoppacciaro, A., Guiducci, C., Torrisi, M.R., and Colombo, M.P. (2003). Leukocyte, rather than tumor-produced SPARC, determines stroma and collagen type IV deposition in mammary carcinoma. *J Exp Med* 198, 1475-1485.

Sansom, O.J., Mansergh, F.C., Evans, M.J., Wilkins, J.A., and Clarke, A.R. (2007). Deficiency of SPARC suppresses intestinal tumorigenesis in APCMin/+ mice. *Gut* 56, 1410-1414.

Sato N, Fukushima N, Maehara N, Matsubayashi H, Koopmann J, Su GH et al (2003) SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* 22:5021–5030

Senoo-Matsuda, N., and Johnston, L.A. (2007). Soluble factors mediate competitive and cooperative interactions between cells expressing different levels of *Drosophila* Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18543-18548.

Shi Q, Bao S, Maxwell JA, Reese ED, Friedman HS, Bigner DD, Wang XF, Rich JN. (2004). Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. *J Biol Chem.* 10;279(50):52200-9.

Simpson, P. (1979). Parameters of cell competition in the compartments of the wing disc of *Drosophila*. *Dev Biol* 69, 182-193.

Socha MJ, Said N, Dai Y, Kwong J, Ramalingam P, Trieu V et al (2009) Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia* 11:126–135

Sova P, Feng Q, Geiss G, Wood T, Strauss R, Rudolf V et al (2006) Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:114–123

Suzuki M, Hao C, Takahashi T, Shigematsu H, Shivapurkar N, Sathyanarayana UG et al (2005) Aberrant methylation of SPARC in human lung cancers. *Br J Cancer* 92:942–948

Tamori Y, Bialucha CU, Tian AG, Kajita M, Huang YC, Norman M, Harrison N, Poulton J, Ivanovitch K, Disch L, Liu T, Deng WM, Fujita Y. (2010) Involvement of Lgl and Mahjong/VprBP in cell competition. *PLoS Biol.* 8(7):e1000423.
Vidal M, Cagan RL (2006). *Drosophila* models for cancer research. *Curr Opin Genet Dev.* 16(1):10-6.

Wang Y, Yu Q, Cho AH, Rondeau G, Welsh J, Adamson E et al (2005) Survey of differentially methylated promoters in prostate cancer cell lines. *Neoplasia* 7:748–760

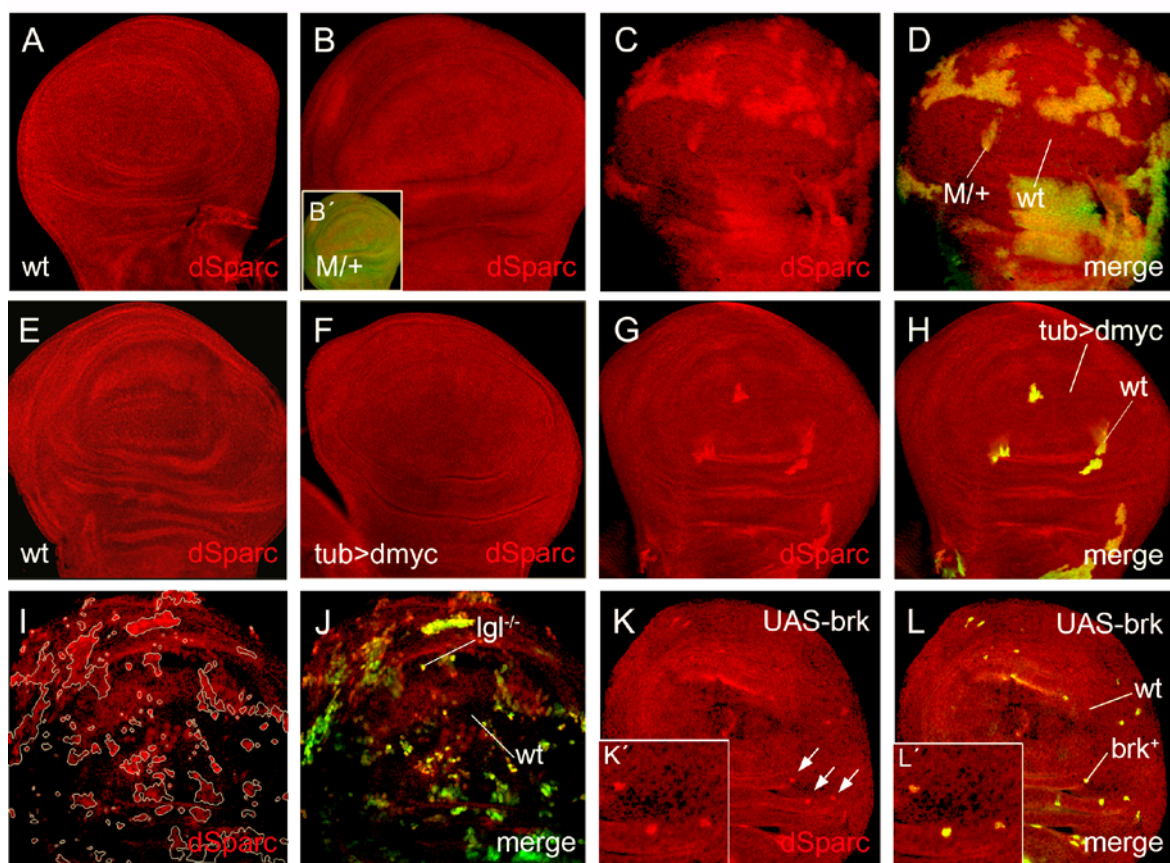
Weaver MS, Workman G, Sage EH (2008). The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta1 and activation of integrin-linked kinase. *J Biol Chem.* 283(33):22826-37.

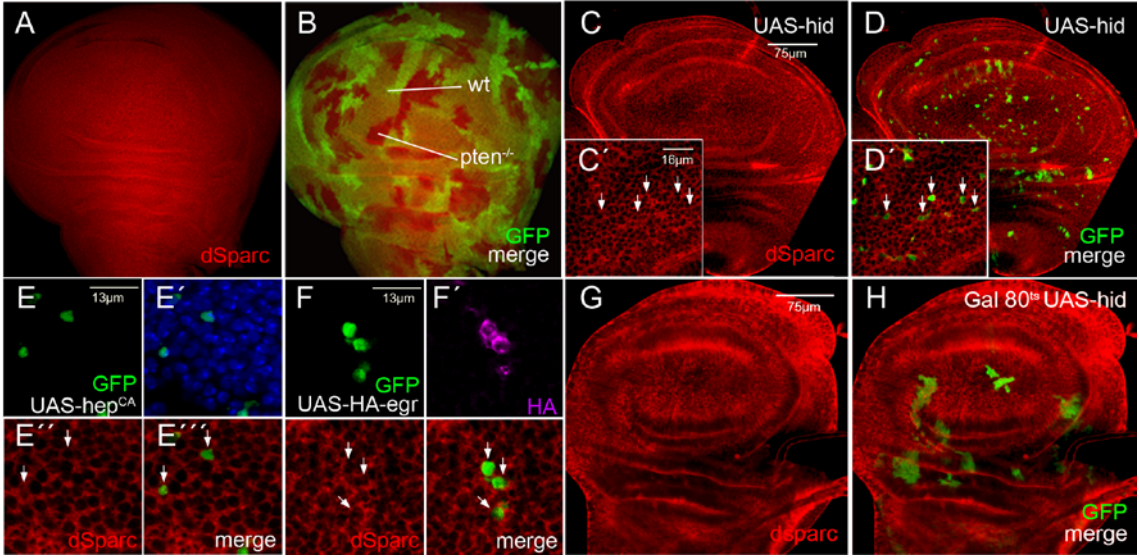
Weinberg, R.A. (2007). *The biology of cancer* (New York, Garland Science).

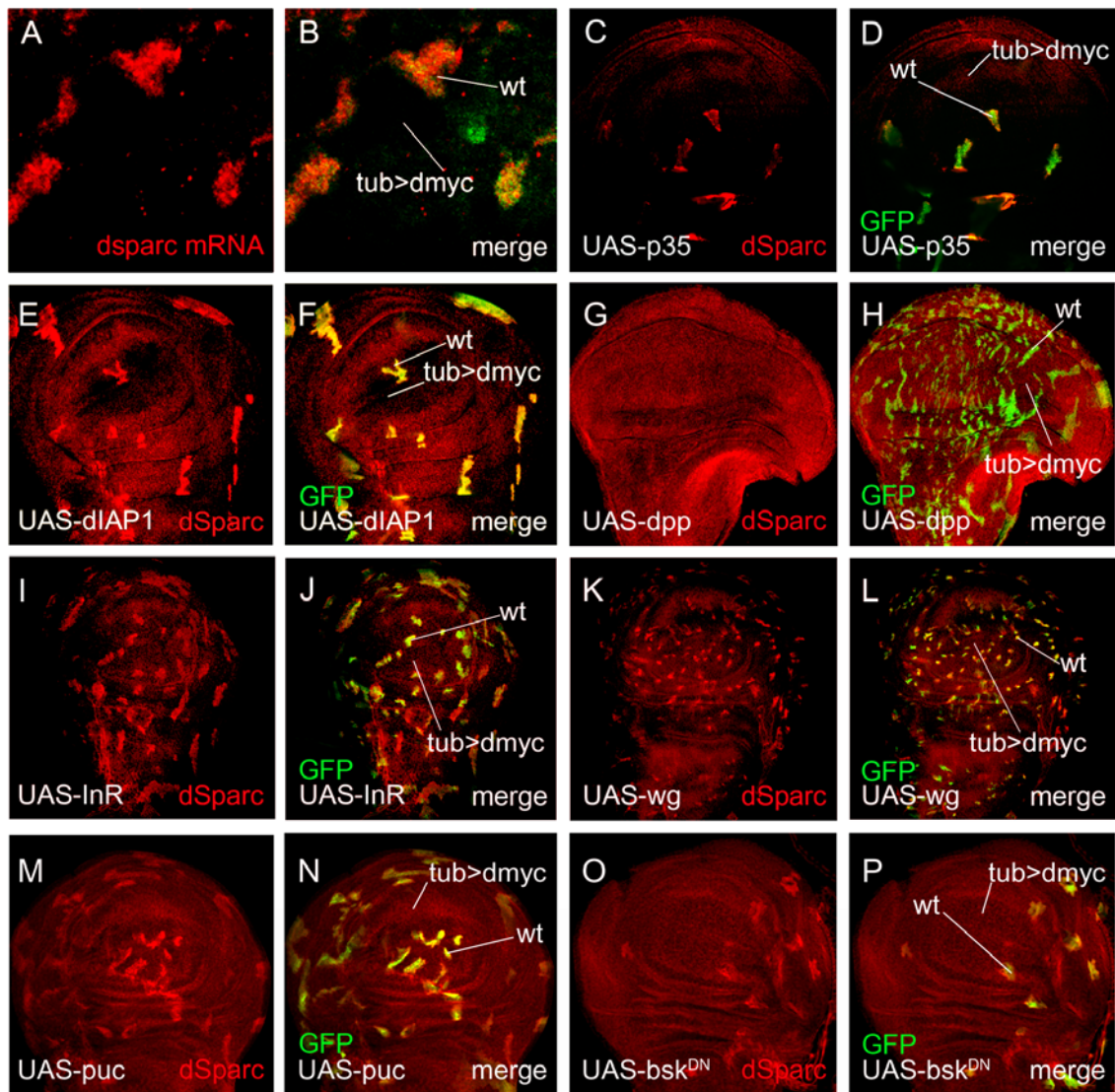
Yang E, Kang HJ, Koh KH, Rhee H, Kim NK, Kim H (2007) Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *Int J Cancer* 121:567–575

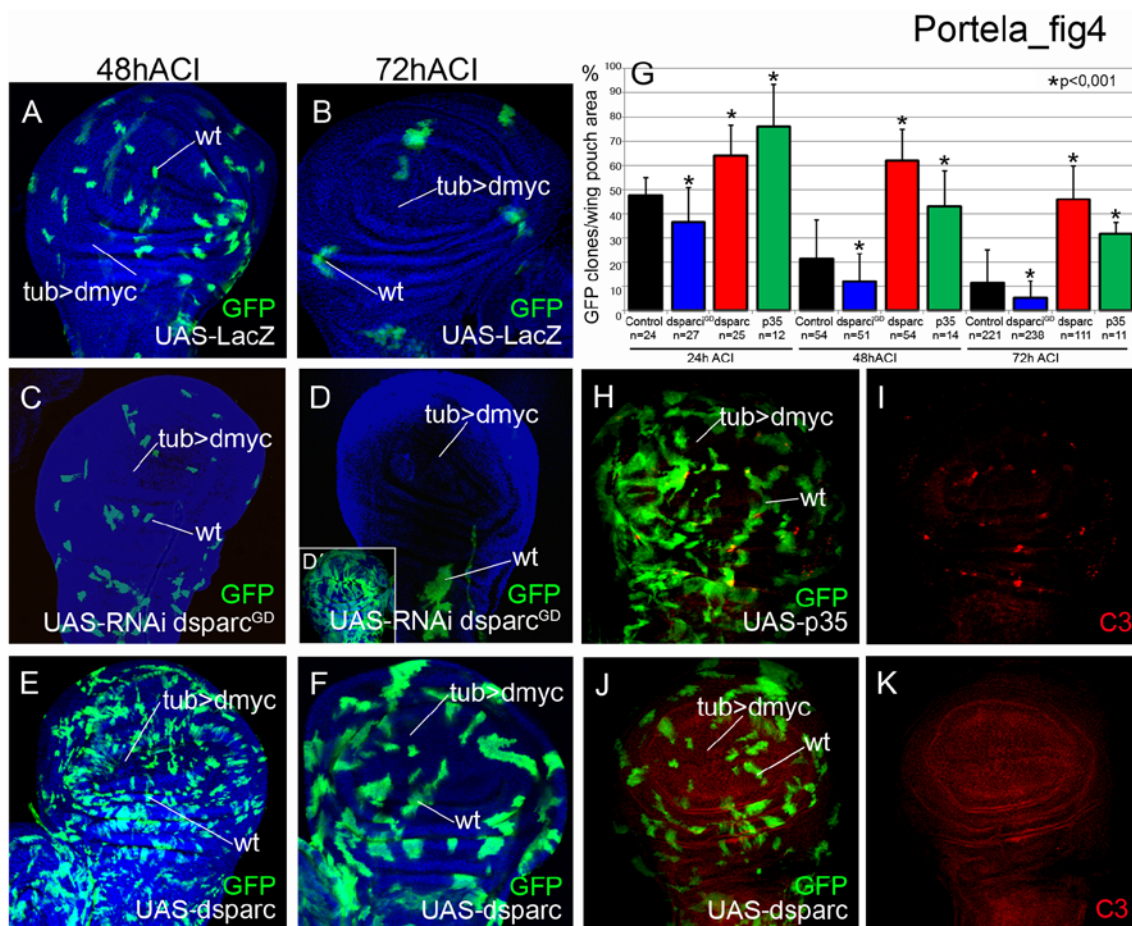
Yao, C.K., Lin, Y.Q., Ly, C.V., Ohyama, T., Haueter, C.M., Moiseenkova-Bell, V.Y., Wensel, T.G., and Bellen, H.J. (2009). A synaptic vesicle-associated Ca²⁺ channel promotes endocytosis and couples exocytosis to endocytosis. *Cell* 138, 947-960.

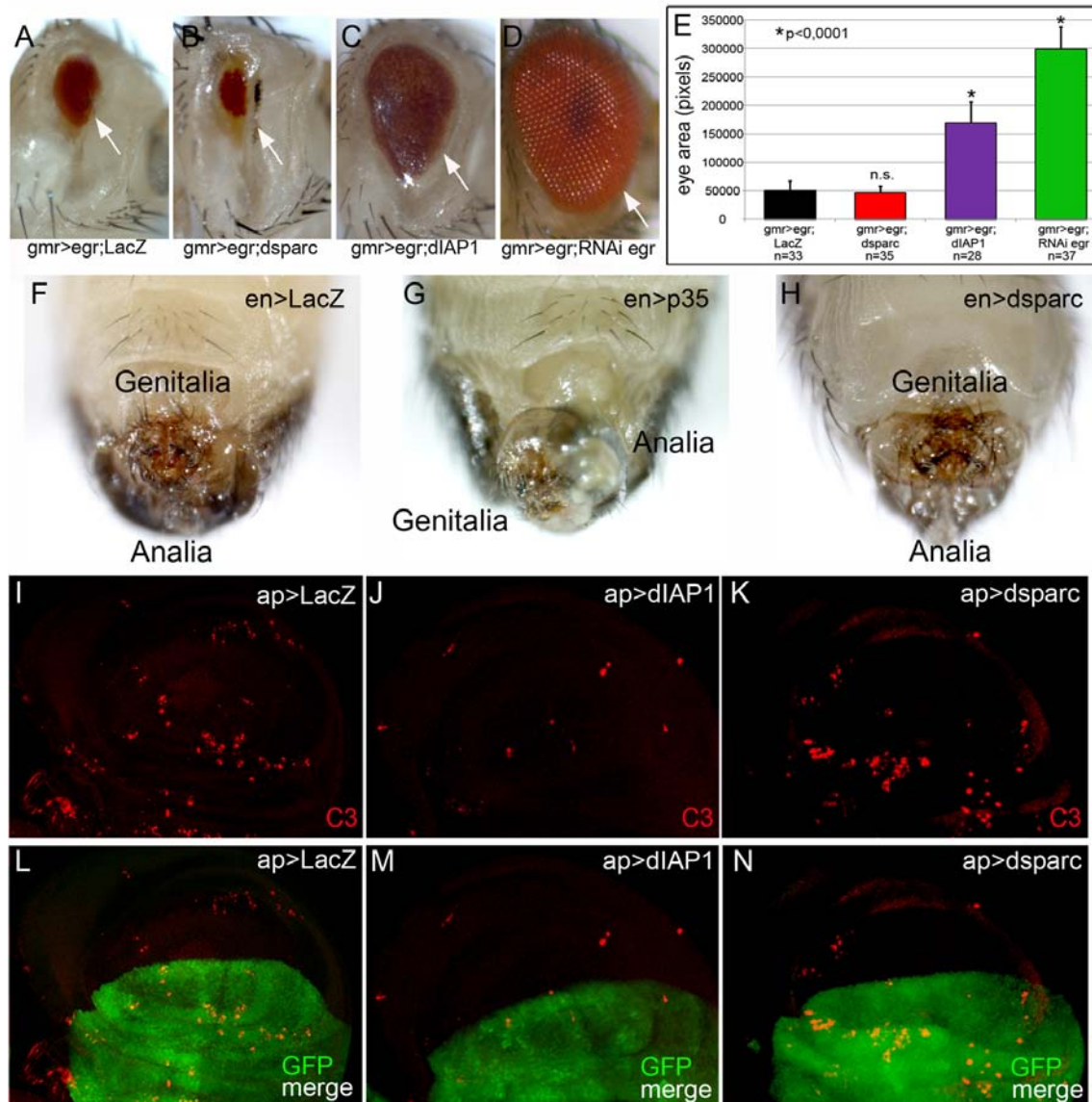
Yoo, S.J., Huh, J.R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S.L., Feldman, R.M., Clem, R.J., Muller, H.A., and Hay, B.A. (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat Cell Biol* 4, 416-424.

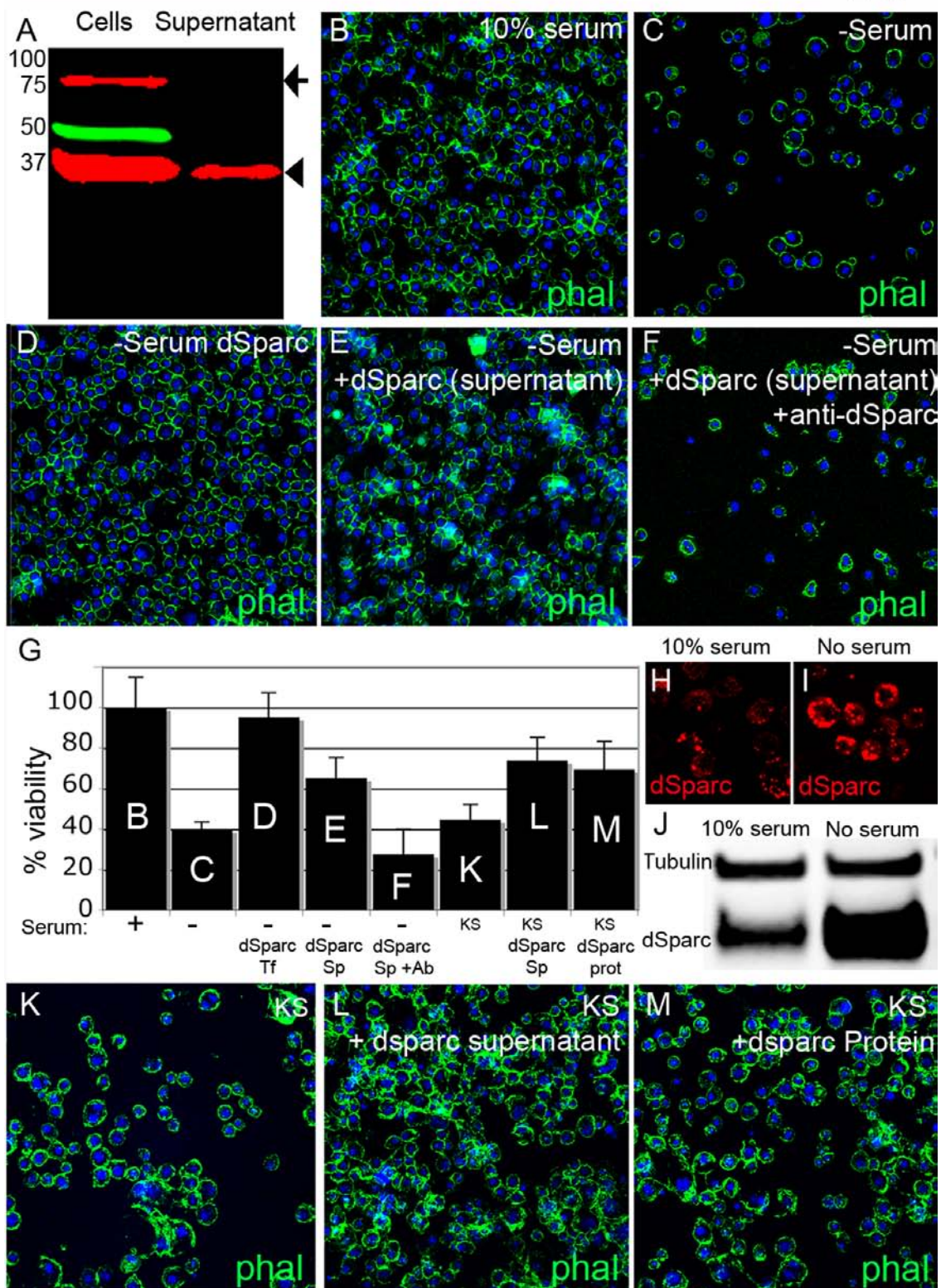


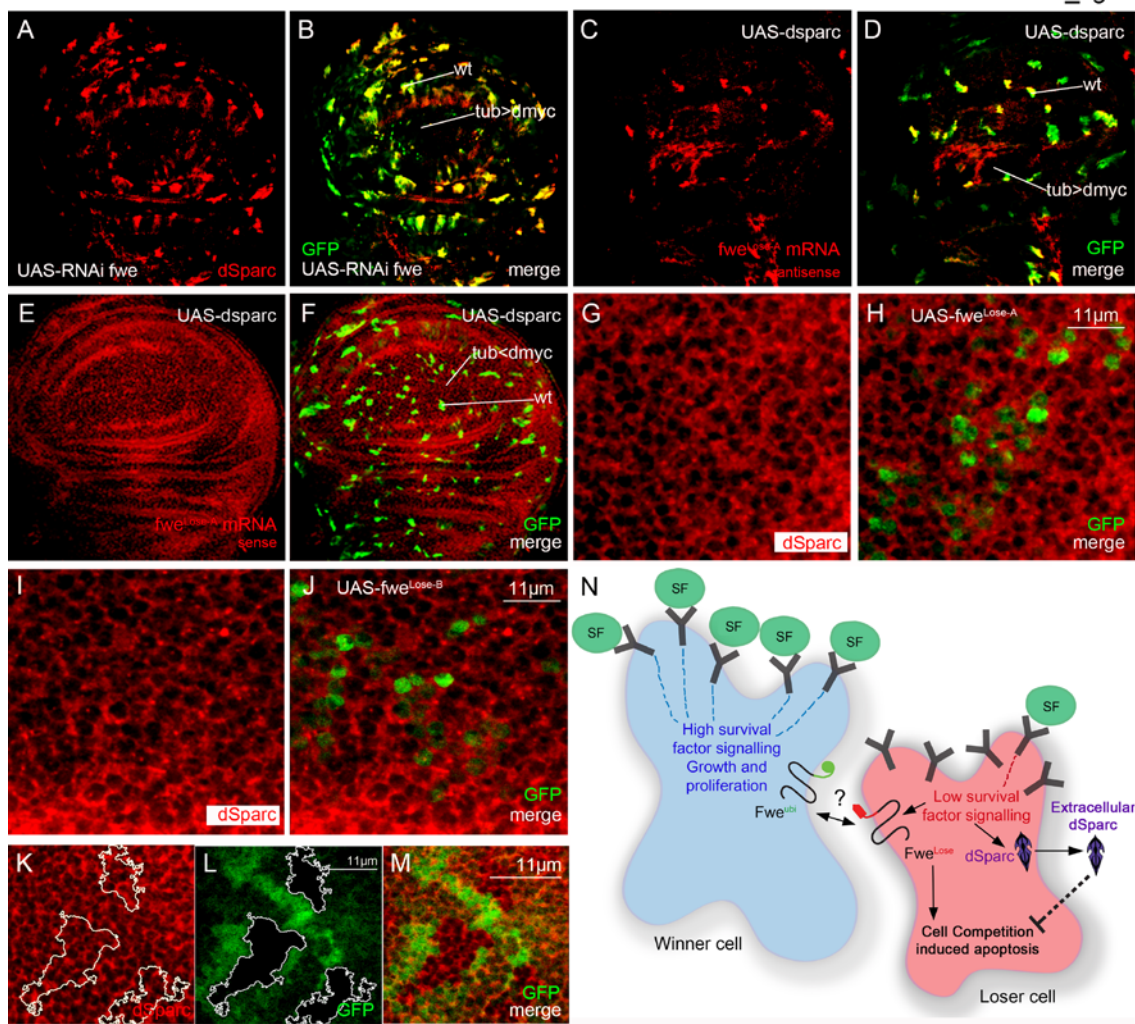












Inventory of Supplemental data

Supplementary Figure 1 (related to Figure 1): Microarray data and table including expression levels of early upregulated genes during cell competition. Aminoacid sequence and domains of dSparc.

Supplementary Figure 2 (related to Figure 4): Functionality of used dSparc loss-of-function tools. Overexpression of dSparc rescues *wt* cells from cell competition. Functionality of used *dsparc* gain-of-function tools and *dsparc* transgenic lines. dSparc levels do not affect dMyc expression nor Dpp signalling.

Supplementary Figure 3 (related to Figure 5): dSparc is not a general inhibitor of apoptosis and does not block X-Ray induced cell death.

Supplemental Experimental Procedures

Microarray analysis

For the microarrays, marked wt cells were generated in a dMyc-overexpressing background with the *tub>dmyc>Gal4* transgene as described in Moreno and Basler, 2004. For control clones, the *tub>cd2>dmyc* transgene was used instead. The cells were marked by including a *UASgfp* reporter. Heat shock was optimized to maximize the amount of boundaries where GFP and non-GFP clones contact each other and mRNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen) and RNeasy (Quiagen) from both genetic setups at 0, 12, 24 and 48 hours and the profiles were analyzed using BDGRC microarrays. The microarray data discussed in this publication have been previously deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE21230 (Rhiner et al., 2010).

In-situ hybridization

mRNA FISH was performed as previously reported (Rhiner et al., 2010). Shortly, discs were fixed in 4% FA and incubated with a digoxigenin-labeled RNA probe O/N or 48h at 56°C. After washing, signal was developed with a mouse anti-digoxigenin antibody (Jackson Immunoresearch) and the tyramide signal amplification system (Invitrogen).

The probe against the predicted off-target *CG11874* of *dsparc* RNAi lines was generated using the following primers:

CG11874 SP6:

5'ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGATGGAGAAGCGAACTCAGCGG 3'

CG11874 T7:

5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGTATCCAATGAGTCAACAATGG 3'

wt clones in *tub>dmyc* background expressing effector transgenes and mitotic recombination clones

To generate wt clones in *tub>dmyc* background expressing different *UAS* constructs, crosses were performed as previously described (Moreno and Basler 2004). The following stocks were used: *UAS- LacZ*, *UAS-RNAi dsparc*

(ID 16678, Chr 3, viable), *UAS-RNAi dsparc* (ID 100566, Chr 2, viable) and *w;H2Av-GFP Df(3R)nm136* (Martinek et al, 2008). The larvae were subjected to a 15-min heat shock at 37°C and harvested 48 and 72h ACI.

Supplementary functional assays

To overexpress *UAS-RNAi dsparc* or *UAS-dsparc* in the dorsal compartment of the wing imaginal disc, females of genotype *ap-Gal4 UAS-GFP/CyO* were crossed with *UAS-RNAi dsparc* or *UAS-dsparc* males.

Cell culture and transactivation assays

The plasmid *actα1>Gal4* (gift of K. Basler) was used in the transfections to activate the *UAS* constructs. *dsparc* cDNAs were cloned into KpnI and XbaI restriction sites of *pUASp* in frame with a C-terminal HA epitope or without tag, yielding the expression construct *pUAS-dsparc-HA* and *pUAS-dsparc*. The *pUAS-GFP* vector was used as control. 1.5×10^6 S2 cells were transfected with SuperFect (QIAGEN) using 0.2µg DNA from each construct. Cells were treated with PBS/NaCl 150mM/ Triton 1% buffer to extract proteins.

For immunostaining, transfected cells were fixed and then stained with mouse anti-dSparc (1: 10) or rat anti-HA antibody (1:500) (Roche), phalloidin Alexa fluor 488 (Invitrogen), and fluorescence-coupled secondary antibodies (1:250; Invitrogen). Cells were mounted in Vectashield with DAPI. All Images were taken in a LEICA TCS-SP2-AOBS microscope.

For Western blots, we used NuPAGE Bis-Tris Gels 4-12% (Invitrogen), and the following primary antibodies: rat anti-HA antibody (1:5000) (Roche), mouse anti-tubulin (1:1000000) (Sigma).

Quantifications

The areas occupied by GFP positive clones and the wing pouch areas were quantified in all the discs using Metamorph 7.0 (Molecular Devices). Averages and the standard deviation (SD) were calculated for each timepoint (24, 48 and 72h). All error bars represent SD. Statistical significance was calculated with the Student's T-test.

dSparc antibody and immunohistofluorescence

Imaginal discs were fixed and and incubated with anti-dSparc (1:10) followed by signal amplification with tyramide (Invitrogen). Further antibodies used for immunohistochemistry were :rabbit anti-GFP (1:250) (Invitrogen), rat anti-HA (Roche), rabbit anti-pMad (1:400) (G. Morata), mouse anti-dMyc (R.N. Eisenman and B.A. Edgar), mouse anti-Wg (DSHB)All images were obtained with a LEICA TCS-SP2-AOBS.

Supplemental figure legends

Supplementary Figure 1: Microarray data and aminoacid sequence and domains of dSparc.

(A) Gene expression microarray analysis to identify markers of cell competition. The transcriptional profile of imaginal discs where cell competition was induced was compared with control samples where no cell competition occurred. Among the genes that were differentially expressed we selected *CG6378* (*dsparc*, red line). (B) Aminoacid sequence and domains of dSparc. The signal peptide is represented in red. The N-terminal acidic domain is shaded in yellow. The Follistatin-like domain is shown in blue and the extracellular calcium binding domain is depicted in light orange (Adapted from Martinek et al. 2002). The peptide recognized by the antibody is marked in green.

Supplementary Figure 2: Functionality of used dSparc loss-of-function and gain-of-function tools. Overexpression of dSparc rescues *wt* cells from cell competition. dSparc levels do not affect dMyc expression nor Dpp signalling.

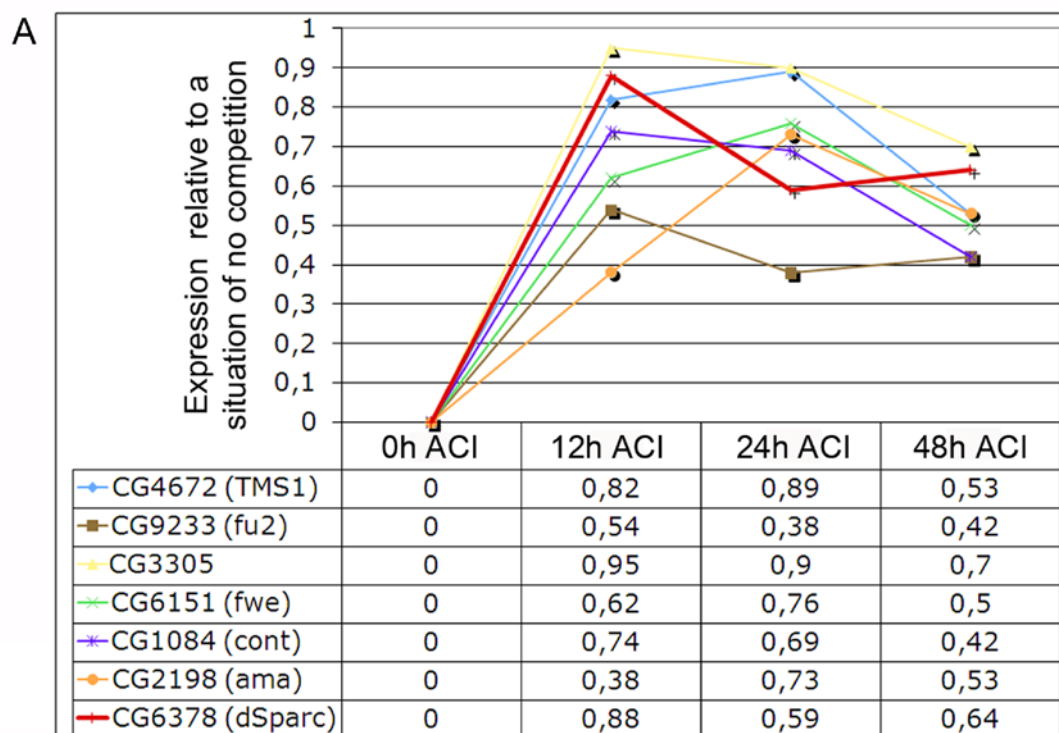
(A-C) Reduction of dSparc protein by RNAi ((A), red) in the dorsal compartment (green (B), merged image (C)). (D-F) RNAi of *dsparc* in the dorsal compartment (green) (E) driven by the *ap-Gal4* promoter does not reduce the expression of *CG11874*, a potential off-target of the *dsparc* RNAi construct shown by in-situ hybridization against *CG11874* mRNA (red) (D). (F) In-situ hybridization against *CG11874* mRNA with the sense probe as a negative control. (G) Quantification of remaining loser clones in the supercompetitor assay at various timepoints ACI. The wing pouch is marked by wingless (red), the number of animals analyzed is indicated (n). Error bars represent SD. The asterisk indicates statistical significance in a Student's T-Test.

(H) *GFP*-marked *wt* cells (green) in a *tub>dmyc* background 48h and (L) 72h ACI. *Wt* loser cells are gradually outcompeted, first in the wing pouch until only a few clones remain in the periphery of the disc. (I) *GFP*-marked *wt* cells (green) in a *tub>dmyc* background in a disc heterozygously mutant for a deletion in *dsparc* 48h and (M) 72h ACI. *wt* loser cells are outcompeted faster in

the wing pouch of *dsparc* heterozygously mutant discs compared to the control. (J, N) RNAi of *dsparc* (GD collection, Chr 3) specifically activated in GFP-marked loser cells facing dMyc-expressing supercompetitors, leads to a faster reduction of the loser clones (green) at 48h (J) and (N) 72h ACI compared to *wt* cells (H and L, respectively). (K, O) RNAi of *dsparc* (KK collection) specifically expressed in the losers which are marked by GFP leads to a faster reduction of loser clones (green) at 48h (K) and (O) 72h ACI compared to *wt* cells (H and L, respectively). (P-Q) Representative picture of *dSparc-HA* overexpression in the dorsal compartment (red, anti-dSparc Ab) using the created *UAS-dsparc* transgenic lines. (P) The dorsal compartment shows the overexpression of dSparc in red (anti-dSparc Ab), the endogenous expression of dSparc can be observed in the ventral compartment. (Q) Staining against HA in magenta shows the expression of dSparc-HA. (R) Double Immunostaining of cells transfected with *UAS-dsparcHA* using mouse monoclonal antibody against dSparc (green) and rat anti-HA antibody to detect HA-tagged dSparc (red). Note that the anti-HA antibody recognizes only the tagged dSparc forms (arrowhead), whereas the anti-dSparc antibody recognizes HA-tagged and endogenous dSparc (arrows). Nuclei are stained with DAPI (blue). (S) Western-blot showing dSparc expression levels of different transgenic lines. (T) Activation of *UAS-RNAi dsparc* or overexpression of *UAS dsparc* (U) in the dorsal compartment (see insets, green) by the *ap-Gal4* promoter does not affect pMad levels (red). (V) Expression of *UAS-RNAi dsparc* in the dorsal compartment (inset, green) does not alter dMyc levels (red) in the wing disc, nor does overexpression of *UAS- dSparc* (W).

Supplementary Figure 3: dSparc does not inhibit X-Ray induced cell death.

(A) Caspase staining (red) in *en-Gal4; UAS-dsparc* discs 24 hours after irradiation with 1500 rads. Note that Caspase 3 is equally induced in cells with high dSparc levels (green) and control cells (black).



B MRSLLWLLGLGLLAVSHVQASTEFSDDLDEDLSDIDENEEFLRLLEEKNKIKDIERENEIATKLAEVQHNLL
 NPVVEVDLCETMSCGAGRICQMHDEKPKCVCIPECPEEVDTRRLVCTNTNETWPSCSVYQQRWCDSGEFGCTNP
 DNAHMHIDYYGACHEPRSCGEDLKDFPRMRDWLFNVMRDLAERDELTEHYMQMELEAETNNSRRWSNAAVWKWC
 DLDGDTDRSVSRHELFPPIRAPLVSLEHCIAFFLESCDSNKHRTITLVEWGACLELDPEDLKERCCDDVQRAQPHLLG

